

Dan it-test hu mahsub purament bhala ghodda ta' dokumentazzjoni u m'ghandu l-ebda effett legali. L-istituzzjonijiet tal-Unjoni m'ghandhom l-ebda responsabbiltà għall-kontenut tiegħu. Il-verżjonijiet awtentiċi tal-atti rilevanti, inklużi l-preamboli tagħhom, huma daww ippubblikati fil-Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea u disponibbli f'EUR-Lex. Daww it-testi uffiċjali huma aċċessibbli direttament permezz tal-links inkorporati f'dan id-dokument

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

tat-30 ta' Mejju 2008

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

(Test b'rilevanza għaž-ŻEE)

(ĠU L 142, 31.5.2008, p. 1)

Emendat minn:

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

**REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (KE) Nru 440/2008****tat-30 ta' Mejju 2008**

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

(Test b'rilevanza għaż-ŻEE)

Artikolu 1

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

Artikolu 2

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

Artikolu 3

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

Artikolu 4

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

Għandu japplika mill-1 ta' Ġunju 2008.

▼B*ANNEX***▼M6***Nota:*

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

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

▼B

PARTI A: METODI GHAD-DETERMINAZZJONI TAL-PROPRJETAJIET FIŻIKO-KIMIČI

WERREJ

- A.1. TEMPERATURA TA' TIDWIB/IFFRIŻAR
- A.2. TEMPERATURA TAT-TGHOLIJA
- A.3. DENSITÀ RELATTIVA
- A.4. PRESSJONI TA' FWAR
- A.5. TENSJONI TAS-SUPERFIČJE
- A.6. SOLUBILITÀ FL-ILMA
- A.8. KOEFFIČJENT TAL-QSIM
- A.9. IL-PUNT TA' FJAMMABILITÀ
- A.10. FJAMMABILITÀ (SOLIDI)
- A.11. FJAMMABILITÀ (GASSIJET)
- A.12. FJAMMABILITÀ (KUNTATT MA' L-ILMA)
- A.13. PROPRJETAJIET PIROFORIČI TA' SOLIDI U LIKWIDI
- A.14. PROPRJETAJIET ESPLOŽIVI
- A.15. TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ -(LIKWIDI U GASSIJET)
- A.16. TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ RELATTIVA GHAL SOLIDI
- A.17. PROPRJETAJIET OSSIDANTI (SOLIDI)
- A.18. IL-MEDJA TAL-PIŻ MOLEKULARI TAN-NUMRU U D-DISTRIBUZZJONI TAL-PIŻ MOLEKULARI TAL-POLIMERI
- A.19. KONTENUT TA' POLIMERI TA' PIŻ MOLEKULARI BAXX
- A.20. L-IMĠIBA TAS-SOLUZZJONI/TA' L-ESTRAZZJONI TA' POLIMERI FL-ILMA
- A.21. PROPRJETAJIET OSSIDIZZANTI (LIKWIDI)
- A.22. ID-DIJAMETRU MEDJU ĠEOMETRIKU TAL-FIBRI PEŻAT SKONT IT-TUL TAGHHOM
- A.23. KOEFFIČJENT TAL-PARTIZZJONI (1-Ottanol/Ilma): METODU TA' THAWWID BIL-MOD
- A.24. KOEFFIČJENT TA' PARTIZZJONI (N-OTTANOL/ILMA), METODU TA' KROMATOGRAFIJA LIKWIDA BI PRESTAZZJONI GHOLJA (HPLC)
- A.25. KOSTANTI TA' DISSOČJAZZJONI FL-ILMA (METODU TA' WINKLER — METODU SPETTROFOTOMETRIKU — METODU KONDUTTOMETRIKU)

▼B**A.1. TEMPERATURA TA' TIDWIB/IFFRIŻAR****1. METODU**

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

1.1. DAHLA

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

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

Konverżjoni ta' unitajiet (K għal °C)

$$t = T - 273,15$$

t: Temperatura Celsius, grad Celsius (°C)

T: temperatura termodinamika, kelvin (K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

▼ B

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

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

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

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

Ammont żgħir tas-sustanza mfarrka sewwa jitpoġġa f'tubu kapillari u jiġi ppakkjat sewwa. It-tubu jissahhan, flimkien ma' termometru, u ż-żieda fit-temperatura tiġi aġġustata għal inqas minn madwar 1 K/min matul it-tidwib innifsu. It-temperaturi tat-tidwib inizzjali u finali jiġu determinati.

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

Kif imfisser taht 1.4.1.1., hliet li t-tubu kapillari u t-termometru jitpoġġew fi blokka msahhna tal-metall, u jistgħu jkunu osservati minn go toqob fil-blokka.

1.4.1.3. *Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula*

Il-kampjun fit-tubu kapillari huwa msahhan awtomatikament f'cilindru tal-metall. Raġġ ta' dawl huwa dirett minn gos-sustanza, permezz ta' toqba fiċ-cilindru, sa fotoċellula kalibrata b'mod preċiż. Il-proprietajiet ottiċi ta' hafna sustanzi jinbidlu minn opak għal trasparenti meta jkunu qed jiddewbu. L-intensità tad-dawl li tilhaq lill-fotoċellula tiżdied u tibghat sinjal ta' waqfien lill-indikatur diġitali li jkun qed jaqra t-temperatura tat-termometru ta' reżistenza tal-platinu li jkun jinsab fil-kompartiment tat-tishin. Dan il-metodu mhuwiex adattat għal xi sustanzi b'kuluri qawwi.

1.4.2. **Uċuh ta' Shana**1.4.2.1. *Il-bank shun Kofler*

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

▼B

1.4.2.2. *Mikroskopju tat-tidwib*

Bosta uċuh shan tal-mikroskopju jintużaw għad-determinazzjoni tat-temperaturi tat-tidwib bi kwantitajiet żgħir ferm ta' materjal. F'hafna minn dawn l-uċuh shan it-temperatura titkejjel b'termokoppja sensitiva iżda xi drabi jintużaw termometri tal-merkurju. Apparat tipiku għad-determinazzjoni tal-punt tat-tidwib fi stadju shun għandu kompartiment ta' shana li fiha pjanċa metallika li fuqha jitqiegħed il-kampjun fuq *slide*. Iċ-ċentru tal-pjanċa metallika għandu toqba li tippermetti d-dhul tad-dawl mill-mera illuminanti tal-mikroskopju. Meta tkun qed tintuża, il-kompartiment tinghalaq bi pjanċa tal-ħgieġ biex teskludi l-arja miz-zona tal-kampjun.

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

1.4.2.3. *Metodu tal-menisku*

Dan il-metodu jintuża b'mod speċifiku għal poliamidi

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

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

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

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

1.4.4. **Analizi termika**1.4.4.1 *Analizi termika differenzjali (ATD)*

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

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

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

1.4.5. Punt ta' tferriegħ

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

TABELLA: APPLIKABILITÀ TAL-METODI

A. Metodi kapillari

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

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

▼B

B. Uċuh shan u metodi ta' ffrizar

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

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

C. Analizi termika

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

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

D. Punt ta' tferrigh

Metodu ta' kejl	Sustanzi li jistghu jittfarrku	Sustanzi li ma jittfarrkux malajr	Skala ta' temperatura	Kalkolu ta' l-eżattezza ⁽¹⁾	Standards eżistenti
Punt ta' tferrigh	ghal żjut tal-pitrolju u sustanzi żejtnin	ghal żjut tal-pitrolju u sustanzi żejtnin	223 sa 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

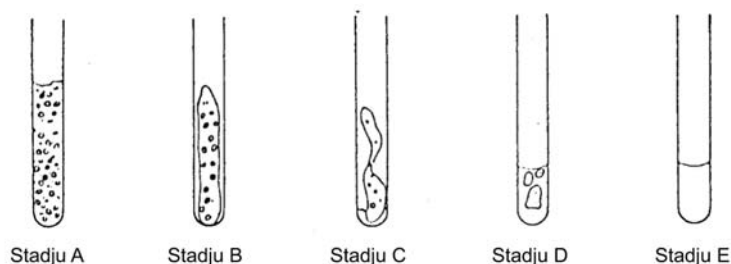
Il-proċeduri għal kważi l-metodi ta' ttestjar kollha tfissru fi standards internazzjonali u nazzjonali (Ara Appendiċi 1)

1.6.1. Metodi permezz ta' tubu kapillari

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

▼ B

Figura 1



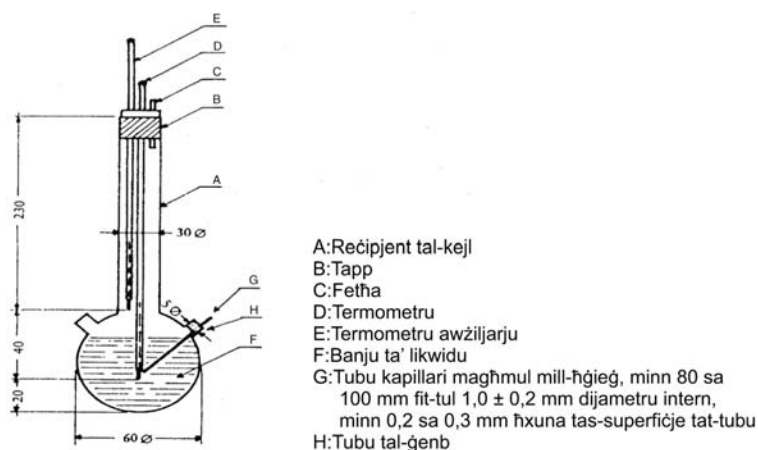
- Stadju A (Bidu tat-tidwib): Qtar żgħar jehlu b'mod uniformi ma' ġewwa tat-tubu kapillari
- Stadju B jidher spazju vojta bejn il-kampjun u l-ġewwa tat-tubu minħabba li t-tidwiba tiċkien
- Stadju C il-kampjun m'ekken jibda jikkollassa 'l isfel u jillikwifa ruhu
- Stadju D menisku komplet jiġi fformat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

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

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

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

Figura 2



▼B*Banju ta' likwidu:*

Ghandu jinghażel likwidu adattat. L-ghażla tal-likwidu tiddependi fuq it-temperatura tat-tidwib li ghandha tiġi determinata, eż. paraffin likwidu għal temperaturi tat-tidwib mhux oghla minn 473 K, żejt tas-silikone għal temperaturi tat-tidwib mhux oghla minn 573 K.

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

Termometru:

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

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

Proċedura:

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

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

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

Kalkolu:

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

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

fejn:

T = it-temperatura tat-tidwib korretta f°K

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

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

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

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

*Apparat:**Dan jikkonsist fi:*

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

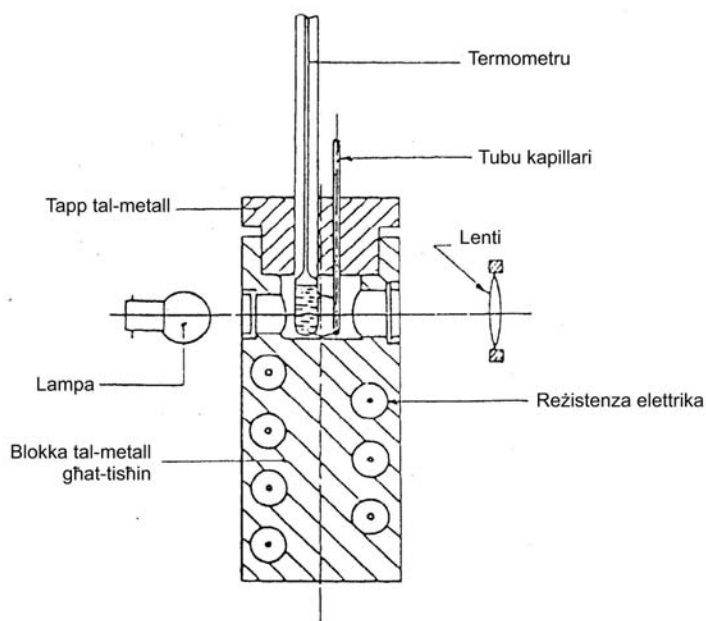
— tapp tal-metall, b'zewġ toqob jew aktar, li jippermetti li tubi jiġu mmuntati fil-blokka tal-metall,

▼B

- sistema ta' tishin, għall-blokka tal-metall, provduta, eż., minn rezistenza elettrika inkorporata fil-blokka,
- reostat għar-regolazzjoni tal-qawwa applikata, jekk jintuża tishin elettriku.
- erba' twieqi ta' hġieġ li jiflah għas-shana fuq il-ġnub laterali tal-kompartiment, imqiegħda dijametrikament f'anglu rett ma' xulxin. Quddiem wahda minnhom tkun immuntata lenti għall-osservazzjoni tat-tubu kapillari. It-tliet twieqi l-oħra jintużaw biex jinxteghel l-intern permezz ta' lampi,
- tubu kapillari ta' hġieġ li jirreżisti s-shana magħluq minn naħa wahda (ara 1.6.1.1).

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

Figura 3

1.6.1.3. *Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula*

Apparat u proċedura:

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

▼B

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

1.6.2. **Uċuħ shan**

1.6.2.1. *Il-bank shun Kofler*

Ara l-Appendiċi

1.6.2.2. *Mikroskopju tat-tidwib*

Ara l-Appendiċi

1.6.2.3. *Metodu tal-menisku (poliamidi)*

Ara l-Appendiċi

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

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

Ara l-Appendiċi

1.6.4. **Analizi termika**

1.6.4.1. *Analizi termika differenzjali*

Ara l-Appendiċi

1.6.4.2. *Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar*

Ara l-Appendiċi

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

Ara l-Appendiċi

2. **DATA**

Korrezzjoni tat-termometru hija neċessarja f' xi każijiet.

3. **RAPPURTAR**

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

— metodu użat

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

— kalkolu ta' l-eżattezza

Il-medja tal-anqas żewġ kejljiet li huma fl-iskala ta' l-eżattezza kalkolata (ara t-tabelli) hija reġistrata bħala t-temperatura tat-tidwib.

▼B

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

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

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

4. **REFERENZI**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803–834.
- (3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
- (4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505–515.

▼B*Appendiċi*

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

1. Metodi kapillari

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

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals

BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range

DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapilarverfahren

JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products.

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

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

ISO 1218 (E)	Plastics- polyamides -determination of "melting point"

2. Elementi Imsahhnin

2.1. Il-bank shun Kofler

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

2.2. Mikroskopju tat-tidwib

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Metodu tal-menisku (poliamidi)

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

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66 Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials

NF T 51-050 Resines de polyamides. Determination du “point de fusion” methode du menisque

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

BS 4633 Method for the determination of crystallizing point

BS 4695 Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)

DIN 51421 Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

ISO 2207 Cires de petrole: determination de la temperature de figeage

DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiuren

NF T 60-114 Point de fusion des paraffines

NF T 20-051 Methode de determination du point de cristallisation (point de Congelation

ISO 1392 Method for the determination of the freezing point

4. **Analizi termika**

4.1. **Analizi termika differenzjali**

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical DATA
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
4.2.	Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical DATA
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
5.	Determinazzjoni tal-punt tat-tferriegħ	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement limite -Monsterneming en ontleding van aardolie-producten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
	ISO 3016	Petroleum oils –Determination of pour point

▼B**A.2. TEMPERATURA TAT-TGHOLIJA****1. METODU**

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

1.1. DAHLA

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

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

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

Rimarki:

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

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

fejn:

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

ΔH_v = is-sħana ta' evaporizzazzjoni tiegħu f' J mol⁻¹

R = il-kostanti universali molari tal-gass = 8,314 mol⁻¹ K⁻¹

T = it-temperatura termodinamika, f' K

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

▼B*Bdil*

Pressjoni (unitajiet: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

("bar" għadha permessa iżda mhux rakkomandata)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

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

1 atm = atmosfera standard = 101 325 Pa

(l-unità "atm" mhix permessa).

Temperatura (unitajiet: K)

 $t = T - 273,15 \text{ K}$

t: temperatura Celsius, grad Celsius (°C)

T: temperatura termodinamika, kelvin (K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-ITTESTJAR

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

1.4.1. Determinazzjoni bl-użu ta' l-ebullimeter

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

1.4.2. Metodu dinamiku

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

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

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

▼B**1.4.4. Metodu skond Siwoloboff**

Kampjun jissahhan f' tubu għall-kampjun, li jkun mghaddas f' likwidu ġo banju shun. Kapillari mghaqda, li fiha buzzieqa ta' l-arja fil-parti t'isfel, tiġi mghaddsa fit-tubu bil-kampjun.

1.4.5. Determinazzjoni permezz ta' fotoċellula

Skond il-prinċipju Siwoloboff, kejl foto-elettriku awtomatiku jsir bit-lugħ tal-bzieżaq.

1.4.6. Analizi termika differenzjali

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

1.4.7. Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

*Tabella 1***Paragun tal-metodi**

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

⁽¹⁾ Din l-eżattezza hija valida biss għall-apparat sempliċi kif eż. mfisser f' ASTM D 1120-72; tista' tkun imtejba b' apparat ebullimeter aktar sofistikati.

⁽²⁾ Validi biss għal sustanzi puri. L-użu f' ċirkustanzi oħra għandu jkun ġustifikat.

▼B**1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI**

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

1.6.1. L-ebullimeter

Ara l-Appendiċi.

1.6.2. Il-metodu dinamiku

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

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

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

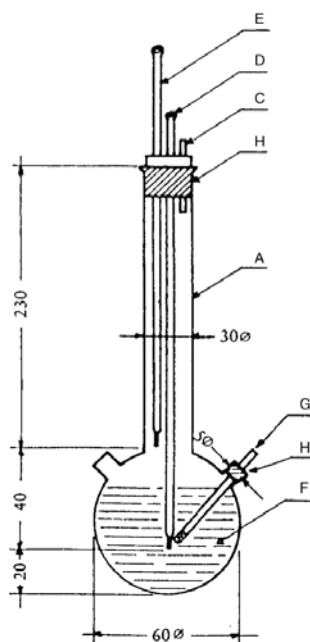
Ara l-Appendiċi.

1.6.4. Il-metodu skond Siwoloboff

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

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

Figura 1



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

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

▼ B

Figura 2

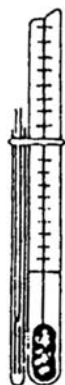
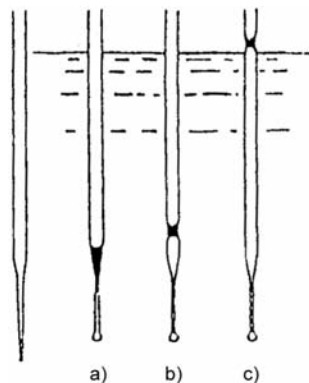
Il-prinċipju skond Siwoloboff

Figura 3

Il-prinċipju mmodifikat

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

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

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

1.6.5. Osservazzjoni permezz ta' fotoċellula

Il-kampjun jissahhan f-tubu kapillari ġo blokka tal-metall imsahhna.

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

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

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

▼B**1.6.6. Analizi termika****1.6.6.1. Analizi termika differenzjali**

Ara l-Appendiċi.

1.6.6.2. Kalorimetrija differenzjali ta' l-iskennjar

Ara l-Appendiċi.

2. DATA

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

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

fejn:

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

P = il-kejl tal-pressjoni f°kPa

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

T = it-temperatura tat-tgħolija mkejla f°K

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

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

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

Tabella 2

Temperatura – il-fatturi ta' korrezzjonijiet f_t

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

▼B**3. RAPPORTAR**

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

- il-metodu użat
- l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet) u l-istadju preliminarju ta' purifikazzjoni, jekk hemm,
- kalkolu ta' l-eżattezza.

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

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

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

4. REFERENZI

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.
- (3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B*Appendiċi*

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

1. **L-ebullimeter**

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

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

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

ISO 918:1989:	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)

BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products

BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics

DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes

NF T 20-608	Distillation:determination du rendement et de l'intervalle de distillation

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

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B**A.3. DENSITÀ RELATTIVA****1. METODU**

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

1.1. DAHLA

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

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

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

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

1.4. TQABBIL TAL-METODI

Jintużaw erba' klassijiet ta' metodi

1.4.1. Il-metodi taż-żamma fil-wiċċ**1.4.1.1. Idrometru (għal sustanzi likwidi)**

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

1.4.1.2. Miżien idrostatiku (għal sustanzi likwidi u solidi)

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

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

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

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

▼B**1.4.2. Metodi piknometriċi**

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

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

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

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI

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

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

2. DATA

Ara l-istandards.

3. RAPPORTAR

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

— il-metodu użat,

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

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

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



Tabella

Applikabilità tal-metodi

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

M4.

REFERENZI

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.
- (3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.
- (4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.II, 427–430.
- (5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.
- (6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen -Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717–726.
- (7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B*Appendiċi*

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

1. **Il-metodi taż-żamma fil-wieċ**

1.1 Idrometru

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

1.2 Miżien idrostatiku

Għal sustanzi solidi

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

Għal sustanzi likwidi

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757 Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62

ASTM D 1298 Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

BS 4714 Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3 Metodu tat-tagħdis ta' l-oġġett

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

2. **Metodi piknometriċi**

2.1. Għal sustanzi likwidi

ISO 3507 Pycnometers

ISO 758 Liquid chemical products; determination of density at 20 °C

DIN 12797 Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)

DIN 12798 Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100. 10⁻⁶ m² s⁻¹ at 15 °C)

DIN 12800 Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)

DIN 12801 Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100. 10⁻⁶ m² s⁻¹ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼B

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

▼B

2.2. Għal sustanzi solidi

ISO 1183 Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-053 Chemical products for industrial use
-Determination of density of solids in powder and liquids -Pyknometric method

DIN 19683 Determination of the density of soils

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

DIN 55990 Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte

DIN 53243 Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼ **M1****A.4. PRESSJONI TA' FWAR****1. METODU**

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

1.1. INTORDUZZJONI

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

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

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

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

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

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

1 Torr	= 1 mm Hg	= $1,333 \times 10^2$ Pa
1 atmosphere	= $1,013 \times 10^5$ Pa	
1 bar	= 10^5 Pa	

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

$$T = t + 273,15$$

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

▼ **M1**

Tabella 1

Metodu ta' kejl	Sustanzi		Ripetibbiltà stmata	Riproducibbiltà stmata	Sensiela rakkomandata
	Solid	Liquid			
Metodu dinamiku	Jinhall malajr	Iva	sa 25 % 1 sa 5 %	sa 25 % 1 sa 5 %	10 ³ Pa sa 2*10 ³ Pa 2*10 ³ Pa sa 10 ⁵ Pa
Metodu statiku	Iva	Iva	5 sa 10 %	5 sa 10 %	10 Pa sa 10 ⁵ Pa 10 ⁻² Pa sa 10 ⁵ Pa ⁽¹⁾
Metodu iżoteniskopju	Iva	Iva	5 sa 10 %	5 sa 10 %	10 ² Pa sa 10 ⁵ Pa
Metodu ta' effuż- joni: bilanċ ta' pressjoni ta' fwar	Iva	Iva	5 sa 20 %	sa 50 %	10 ⁻³ sa 1 Pa
Metodu ta' effuż- joni: Ċellula Knudsen	Iva	Iva	10 sa 30 %	—	10 ⁻¹⁰ sa 1 P
Metodu ta' effuż- joni: termogravi- metrija iżotermali	Iva	Iva	5 sa 30 %	sa 50 %	10 ⁻¹⁰ sa 1 Pa
Metodu ta' satu- razzjoni ta' gass	Iva	Iva	10 sa 30 %	sa 50 %	10 ⁻¹⁰ sa 10 ³ Pa
Metodu ta' dawwâr jdur fuqu nnifsu	Iva	Iva	10 sa 20 %	—	10 ⁻⁴ sa 0.5 Pa

⁽¹⁾ Meta tuġa capacitance manometer

1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST

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

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

fejn:

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

 ΔH_v = is-shana ta' vaporizzazzjoni f'J mol⁻¹R = il-kostanti universali ta' gass, 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = it-temperatura f'K

▼ **M1**

1.4. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza ma ghandhomx ghalfejn jiġu użati. Huma utli primarjament biex jiġi ċċekjat ir-rendiment ta' metodu minn zmien għall-iehor u kif ukoll biex jippermetti paragon bejn riżultati ta' metodi differenti.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.5.1. **Metodu dinamiku (Metodu ta' Cottrell)**1.5.1.1. *Prinċipju*

Il-pessjoni ta' fwar hija determinata billi titkejjel it-temperatura ta' toghlija tas-sustanzi f'pressjonijiet varji speċifikati bejn wiehied u iehor 10^3 u 10^5 Pa. Dan il-metodu huwa wkoll irrikmandat għad-determinazzjoni tat-temperatura ta' toghlija. Għal dak l-ghan huwa utli sa 600K. It-temperaturi ta' toghlija ta' likwidi huma ċirka 0,1 °C oghla f'fond ta' 3 sa 4 ċm milli fil-wiċċ minhabba pressjoni idrostatika tal-kolonna ta' likwidu. Fil-metodu Cottrell (4) it-termometru huwa mqiegħed fil-fwar fuq il-wiċċ tal-likwidu u l-likwidu jagħli jiġi mgieghel jippompja lilu nnifsu kontinwament fuq il-bozza tat-termometru. Saff irqiq ta' likwidu li hu f'ekwilibriju mal-fwar fi pressjoni atmosferika jgħatti l-bozza. It-termometru għalhekk jaqra l-punt ta' toghlija veru, minghajr żbalji kkaġunati minn pressjoni ta' shana eċċessiva u pressjoni idrostatika. Il-pompa li oriġinarjament kienet użata minn Cottrell hija murija fil-figura 1. Tubu A jkun fih il-likwidu jagħli. Fil ta' platinu B issiġillat fil-qiegħ jghin toghlija uniformi. It-tubu tal-ġenb C jagħti għal kondensatur, u l-ghant D jipprevjeni l-kondensat kiesah milli jilhaq it-termometru E. Meta l-likwidu f'A jkun jagħli, b'ziezaq u likwidu maqbuda mill-lenbut jiġu mferra' miż-żewġ idejn tal-pompa F fuq il-bozza tat-termometru.

Figura 1

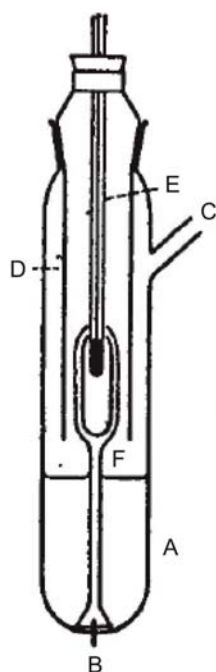
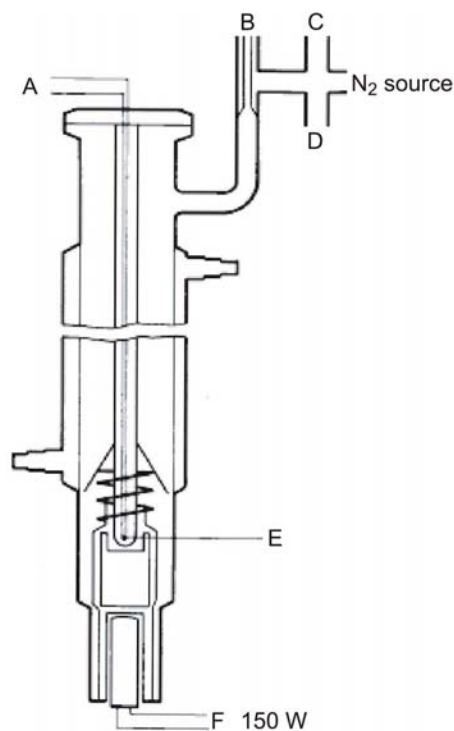


Figura 2



▼ **M1**

Pompa ta' Cottrell (4)

A: Akkopjament termiku

B: Volum ta' buffer ta' vojti

C: Arlogg ta' pressjoni

D: Vojt

E: Punt ta' kejl

F: Element li jsahhan ca. 150 W

1.5.1.2. *Apparat*

Apparat magħmul b'reqqa kbira, li juża l-prinċipju Cottrell, huwa muri fil-figura 2. Jikkonsisti ftubu b'sezzjoni ta' toghlija fil-parti l-iktar baxxa, apparat li jkessah fil-parti tan-nofs, u ftuħ u xifer fil-parti iktar 'il fuq. Il-pompa Cottrell hija mqieghda fis-sezzjoni ta' toghlija li hija msahhna permezz ta' cartridge elettriku. It-temperatura hija mkejla b'akkopjament termiku mgħotti b'materjal li jifred, jew termometru ta' rezistenza li jidhol minn max-xifer ta' fuq. Il-ftuħ huwa mwahhal mas-sistema ta' regolazzjoni ta' pressjoni. Dan tal-aħħar jikkonsisti f'pompa ta' vojti, volum ta' buffer, manostat biex jerhi n-nitroġenu jidhol sabiex tiġi regolata l-pressjoni u manometru.

1.5.1.3. *Proċedura*

Is-sustanza hija mqieghda fis-sezzjoni ta' toghlija. Jistgħu jinholqu problemi rigward solidi li mhumix trab iżda dawn jistgħu xi kultant jissolvew billi jissahhan il-materjal ta' kesha li jgħatti. L-apparat huwa issigillat fix-xifer u jitneħħa l-gass mis-sustanza. Sustanzi li jipproduċu raghwa ma jistgħux jiġu mkejla b'dan il-metodu.

L-iktar pressjoni baxxa mixtieqa hija mbaġħad issettjata u s-sistema ta' shana hija mixgħula. Fl-istess hin, is-sensur tat-temperatura huwa mwahhal ma' registratur.

Ekwilibriju jintlaħaq meta temperatura kostanti ta' toghlija hija rreġistrata waqt pressjoni kostanti. Irid ikun hemm attenzjoni partikolari biex jiġu evitati skossi waqt it-toghlija. Barra minn hekk, kondensazzjoni shiħa trid isseħħ fuq l-element li jkessah. Meta tkun qed tiġi ddeterminata l-pressjoni ta' fwar ta' solidi li jinhallu b'mod baxx, għandha tingħata attenzjoni biex il-kondensatur ma' jithalliex jehel.

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

1.5.2. **Metodu statiku**

1.5.2.1. *Prinċipju*

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

▼ M1

1.5.2.2. *Apparat*

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

1.5.2.3. *Proċedura*

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

Figura 3a

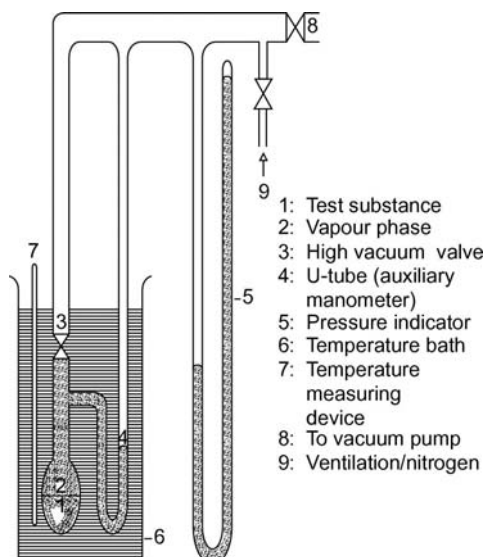
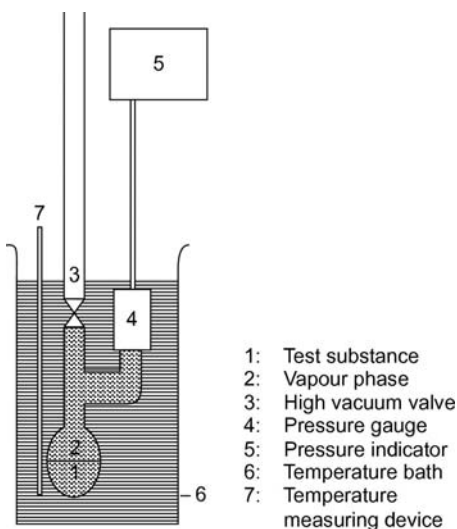


Figura 3b



▼ **M1**

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

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

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

- i) il-kampjun għad fih l-arja (eż fil-każ ta' materjali viskużi hafna) jew sustanzi b'togħlija baxxa li jgħorġu waqt li jkun qed jiġi msahhan;
- ii) is-sustanza tkun suġġetta għal reazzjoni kimika fis-sensjela ta' temperaturi mistharrġa (eż dekompożizzjoni, polimerizzazzjoni).

1.5.3. **Metodu ta' Izoteniskopju**

1.5.3.1. *Prinċipju*

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

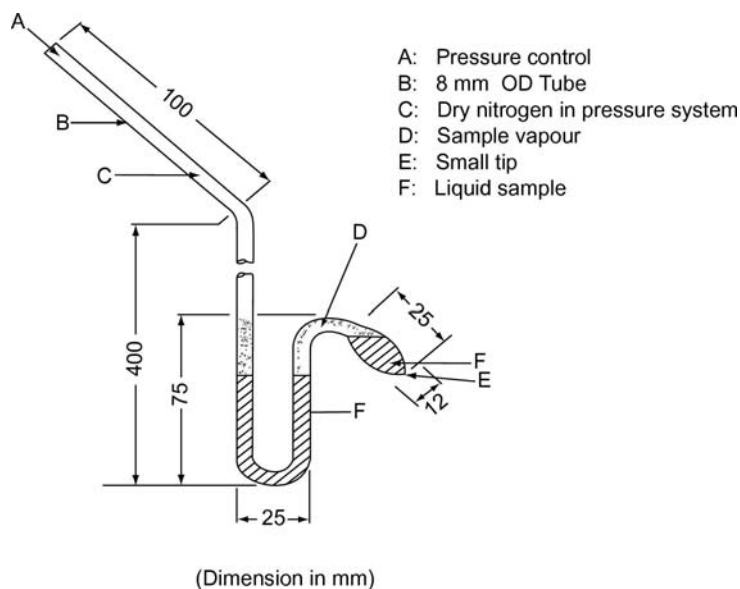
1.5.3.2. *Apparat*

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

▼ **M1**1.5.3.3. *Proċedura*

Fil-każ ta' likwidi, is-sustanza nnifisha sservi bħala l-likwidu fil-manometru differenzjali. Kwantità tal-likwidu, biżżejjed biex timla l-bozza u l-iqsar sieq tal-manometru, hija mqiegħda fuq l-iżoteniskopju. L-iżoteniskopju huwa mwahħal ma' sistema ta' vojt u mbattal, imbagħad mimli bin-nitroġenu. It-tbattil u t-tisfija tas-sistema huma ripetuti darbtejn biex jitneħħa l-oġġetti li jifdal. L-iżoteniskopju mimli huwa mqiegħed f'pożizzjoni orizzontali sabiex il-kampjun jinxtered u jiffirma saff irqieg fil-bozza tal-kampjun u manometru. Il-pessjoni tas-sistema titnaqqas għal 133 Pa u l-kampjun huwa msahħan bil-mod sakemm jagħli (tneħħija ta' gassijiet mahlula). L-iżoteniskopju huwa mbagħad imqiegħed b'ċertu mod li l-kampjun jirritorna lejn il-bozza u jimla s-sieq il-qasira tal-manometru. Il-pessjoni tinzamm 133 Pa. Il-qarnuna mahruga 'l barra tal-bozza tal-kampjun hija msahħna bi fjamma żgħira sakemm il-fwar tal-kampjun li johroġ jespandi biżżejjed b'mod li jharrek parti mill-kampjun mill-parti l-iktar 'l fuq tal-bozza u id tal-manometru u jqiegħda fil-manometru, waqt li johloq spazzju mimli bil-fwar u hieles minn nitroġenu. L-iżoteniskopju huwa mbagħad imqiegħed f'banju b'temperatura kostanti, u l-pessjoni tan-nitroġenu hija agġustata sakemm tigi daqs dik tal-kampjun. Fl-ekwilibriju, il-pessjoni tan-nitroġenu tigi daqs dik tal-fwar tas-sustanza.

Figura 4



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

▼ **M1**1.5.4. **Metodu ta' effużjoni: bilanċ ta' pressjoni ta' fwar (7)**1.5.4.1. *Prinċipju*

Kampjun tas-sustanza tat-test jiġi msahhan f'forn zgħir u mqiegħed f'vażett forma ta' qampiena (bell jar) mbattal. Il-forn huwa mgħotti b'għatu li fih toqob zgħar ta' dijametri magħrufa. Il-fwar tas-sustanza, li johroġ minn wahda mit-toqob, huwa mmexxi għal fuq plattina ta' miżien sensitiv hafna li huwa wkoll magħluq fil-vażett forma ta' qampiena. F'xi diżinni l-plattina tal-miżien hija mdawwra b'kaxxa li tkessah li ttiprovdi hrug ta' shana 'l barra permezz ta' konduzzjoni termika, u hija mkessha b'radjazzjoni sabiex il-fwar li johroġ jikkondensa fuqha. Il-momentum tal-merżuq ta' fwar jahdem bħala forza fuq il-miżien. Il-pressjoni ta' fwar tista' tiġi b'żewġ modi: direttament mill-forza fuq il-plattina tal-miżien u wkoll mir-rata ta' evaporazzjoni li tuża l-ekwazzjoni Hertz-Knudsen (2):

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

fejn:

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

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

T = temperatura (K)

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

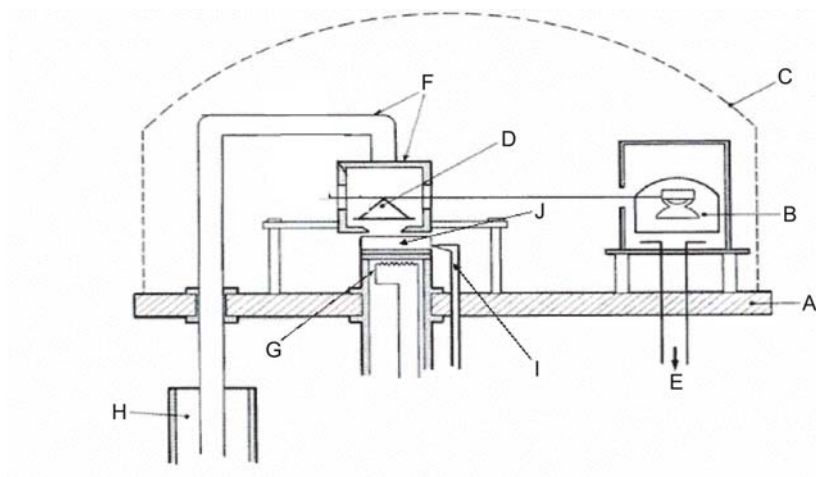
P = pressjoni ta' fwar (Pa)

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

1.5.4.2. *Apparat*

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

Figura 5



A:	Sett ta' bażi	F:	Kaxxa li tkessah u lasta li tkessah
B:	Għodda bi spirall jimxi	G:	Forn evaporatur
C:	Važett forma ta' qampiena	H:	Kunjett Dewar b'nitroġenu likwidu
D:	Miżien bi plattina	I:	Kejl ta' temperatura ta' kampjun
E:	Dispożittiv li jkejjel il-vojt	J:	Sustanza tat-test

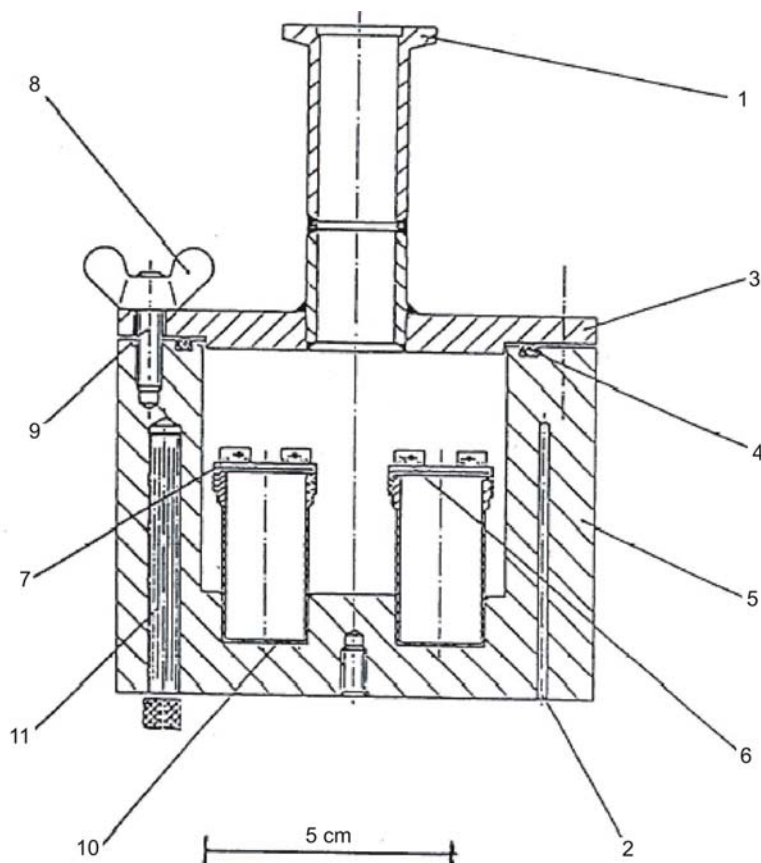
▼ **M1****1.5.5. Metodu ta' effużjoni: Ċellula Knudsen****1.5.5.1. Prinċipju**

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

1.5.5.2. Apparat

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

Figura 6



1: Konnessjoni mal-vojt	7: Għatu mehjut
2: Bjar minn termometru ta' rezistenza tal-platinu jew kejl ta' temperature u kontroll	8: Skorfini farfett
3: Għatu għat-tank tal-vojt	9: Viti
4: Ċirku-O	10: Ċelluli ta' effużjoni b'hadid li ma jissaddadx
5: Tank tal-vojt tal-aluminju	11: Cartridge li ssahhan
6: Dispozittiv biex tinstalla u tneħhi ċ-ċelloli ta' effużjoni	

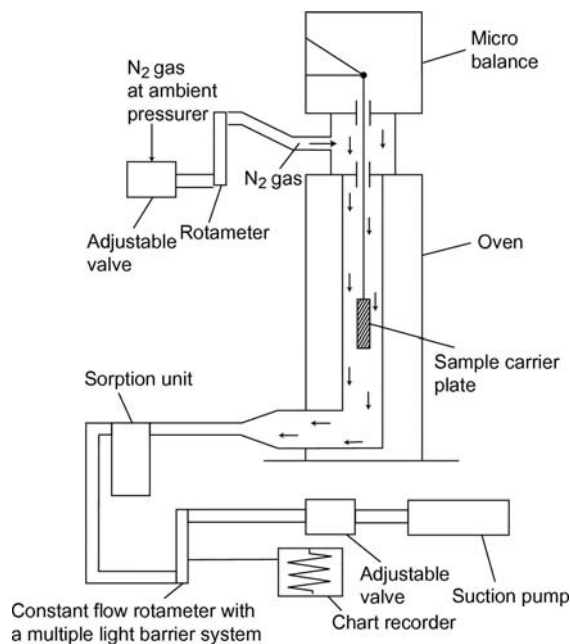
▼ **M1**1.5.6. **Metodu ta' effużjoni: termogravimetrija iżotermali**1.5.6.1. *Prinċipju*

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

1.5.6.2. *Apparat*

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

Figura 7



Il-keffa li għorr il-kampjun, imdendel fuq mizien micro f'kamra b'temperatura kkontrollata, huwa miġbud permezz ta' nixxiegha ta' gass nitroġenu niexef li jgħorr il-molekuli vaporizzati tas-sustanza tat-test lil hinn. Wara li thalli l-kamra, in-nixxiegha ta' gass hija ppurifikata b'unità ta' assorbiment.

1.5.6.3. *Proċedura*

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

▼ **M1**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.7.1. *Prinċipju*

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

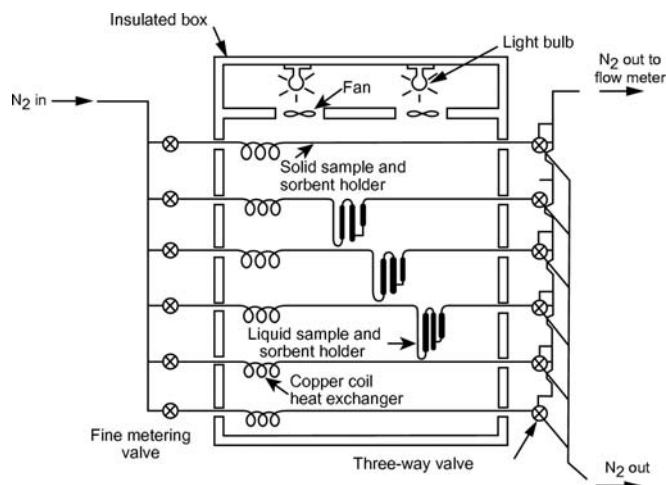
Il-proċedura ta' saturazzjoni ta' gass hija applikabbli għal sustanzi kimiċi solidi jew likwidi. Tista' tiġi użata għal pressjonijiet ta' fwar sa 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14). Dan il-metodu huwa l-iktar ta' min joqgħod fuqu għal pressjonijiet ta' fwar taht 10^3 Pa. Fuq 103 Pa, il-pessjonijiet ta'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

1.5.7.2. *Apparat*

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

▼ M1

Figura 8



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

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

Figura 9

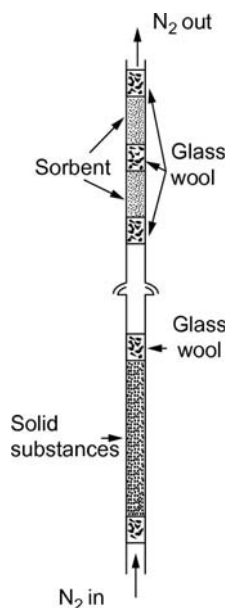
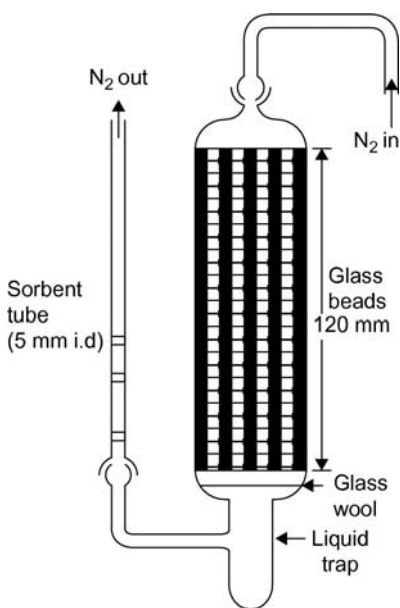


Figura 10



▼ **M1**

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

Trappoli mkessha b'CO₂ solidu huwa metodu effiċjenti iehor kif jingabar il-materjal vaporizzat. Huma ma jikkawżaw l-ebda pressjoni b'lura fuq il-kolonna tas-saturatur u huwa hafif hafna li kwantitattivament jitneħħa l-materjal maqbud.

1.5.7.3. *Proċedura*

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

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

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

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

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

fejn:

p = pressjoni ta' fwar (Pa)

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

V = volum ta' gass saturat (m³)

R = kostanti universali ta' gass 8,314 (J mol⁻¹ K⁻¹)

T = temperatura (K)

M = massa molari tas-sustanza tat-test (g mol⁻¹)

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

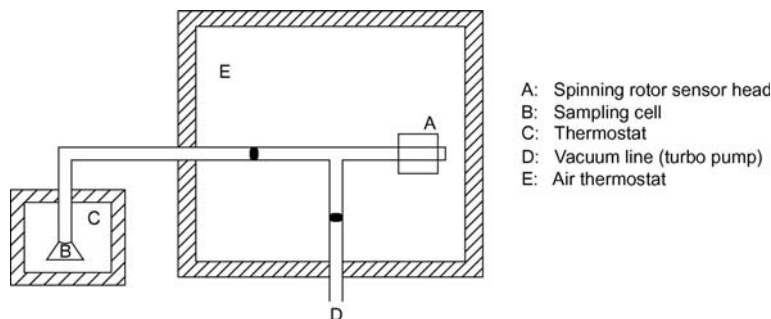
▼ **M1****1.5.8. Dawwar li jdur fuqu nnifsu****1.5.8.1. Prinċipju**

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

1.5.8.2. Apparat

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

Figura 11

**2. DEJTA U RAPPORTAR****2.1. DEJTA**

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

2.2. RAPPORT TAT-TEST

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

— metodu użat,

▼ **M1**

- speċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet) u pass preliminarju ta' purifikazzjoni, jekk ikun hemm,
- mill-inqas żewġ valuri ta' pressjoni ta' fwar u temperatura — u preferibbilment tlieta jew iktar — rikjesti fis-sensjela minn 0 sa 50 °C (jew 120 sa 150 °C),
- mill-inqas waħda mit-temperaturi għandha tkun 25 °C jew inqas, jekk teknikament possibli skont il-metodu magħżul,
- id-dejta kollha oriġinali,
- kurva ta' $\log p$ versus $1/T$,
- stima tal-pressjoni ta' fwar f'20 jew 25 °C.

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

- natura tal-bidla,
- temperatura li fiha l-bidla sseħħ fi pressjoni atmosferika,
- pressjoni ta' fwar f'10 u 20 °C inqas mit-temperatura ta' tranżizzjoni u 10 u 20 °C iktar minn din it-temperatura (sakemm it-tranżizzjoni hija minn solidu għal gass).

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

3. **LETTERATURA**

- (1) *Il-Gurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej* L 383 A, 26-47 (1992).
- (2) Ambrose, D. (1975). *Experimental Thermodynamics*, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.
- (3) Weissberger R., ed. (1959). *Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.
- (4) Glasstone, S. (1946). *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
- (5) NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^5 Pa — Static method.
- (6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
- (7) NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼ **M1**

- (8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz.*, 29, 1979; (1911), 34, 593.
- (9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.
- (10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; *Pest Management Science* 56, 521-532.
- (11) Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual*, Twelfth Edition (2000)
- (12) Friedrich, K., Stambach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog.* 16 (1964), 22-28
- (13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269-278.
- (14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117-122.
- (15) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137-147.
- (16) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393-400.
- (17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161-168.
- (18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27-31.
- (19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science*, 53 (1998) 300-310.
- (20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87(12) (1998) 1512-20.
- (21) Lide, D.R. (ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.
- (22) Meister, R.T. (ed.), *Farm Chemicals Handbook*, Vol. 88 (2002)
- (23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC

▼ M1

- (24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.
- (25) Westcott et al. (1981). *Environ. Sci. Technol.* 15, 1375.
- (26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 5(4), 2440.
- (27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol.* 17(2), 642.
- (28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 3(3), 1715.

▼ **M1***Appendiċi***Metodu ta' stima****INTORDUZZJONI**

Valuri stmati ta' pressjoni ta' fwar jistgħu jintuzaw:

— biex jiġi deċiż liema metodu sperimentali huwa xieraq;

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

METODU TA' STIMA

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

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

PROCEDURA TA' KALKOLAZZJONI

Il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata kif ġej:

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

fejn:

T = temperatura ta' interess

T_b = punt ta' toġhlja normali

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

ΔH_{vb} = shana ta' vaporizzazzjoni

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

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

Flimkien ma',

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

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

▼ M1

Hafna drabi, tezisti dejta fejn jinghata l-punt ta' toghlija f'pressjoni mnaqqsa. F'każ bhal dan, il-pressjoni ta' fwar hija kkalkulata kif ġej:

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

fejn, T_1 hija l-punt ta' toghlija fil-pressjoni mnaqqsa P_1 .

RAPPORT

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

LETTERATURA

- (a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.
- (b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.
- (c) OECD Environmental Monograph Nru.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B**A.5. TENSJONI TAS-SUPERFIĊJE****1. METODU**

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

1.1. DAHLA

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

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

It-tensjoni tas-superfiċje tingħata bħala:

N/m (unità SI) jew

mN/m (sub-unità SI)

1 N/m = 103 dini/cm

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

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

1.4. PRINĊIPJI TAL-METODI

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

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

▼B**1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODI**

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

1.6.1. Il-metodu tal-pjanċa

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

1.6.2. Metodu ta' l-istaffa

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

1.6.3. Metodu tal-holqa

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

1.6.4. Il-metodu armonizzat tal-holqa ta' l-OECD**1.6.4.1. Apparati**

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

— il-mejda mobbli għall-kampjun,

— is-sistema ta' kejl tal-qawwa,

— korp tal-kejl,

— reċipjent tal-kejl.

1.6.4.1.1. Mejda mobbli għall-kampjun

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

1.6.4.1.2. Sistema ta' kejl tal-qawwa

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

▼B

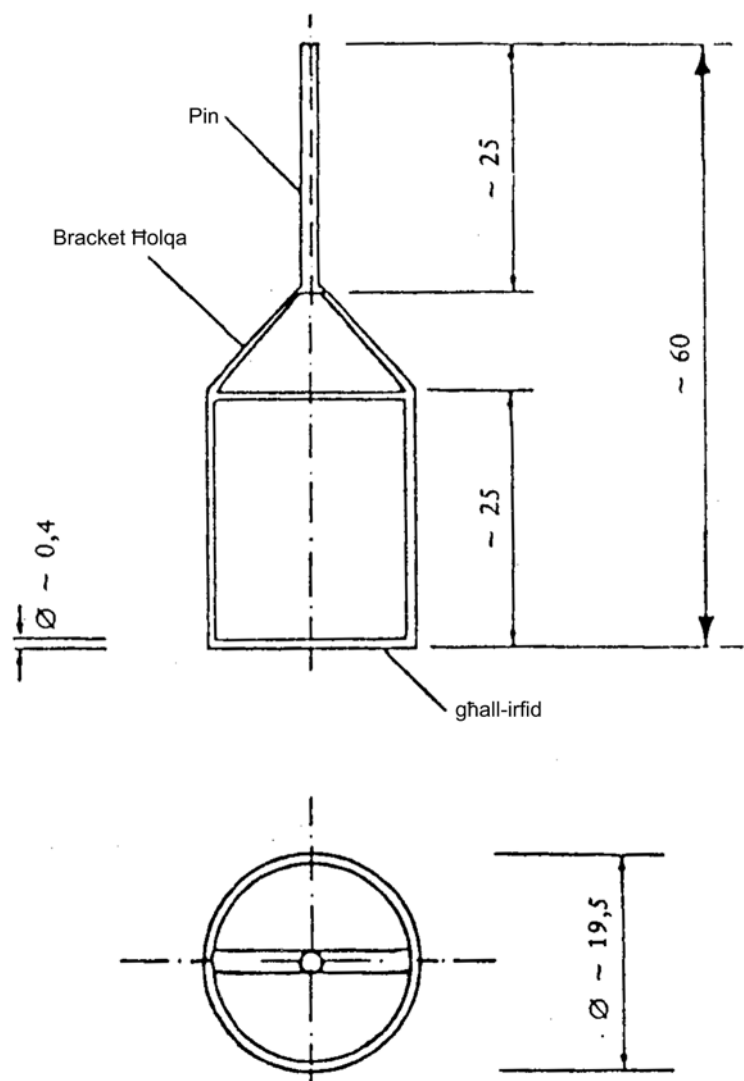
1.6.4.1.3. Korp ta' kejl (holqa)

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

Figura

Korp tal-kejl

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



1.6.4.1.4. Reċipjent tal-kejl

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

▼B1.6.4.2. *Preparazzjoni ta' l-apparat*1.6.4.2.1. *Tindif*

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

Il-holqa trid l-ewwel titlahlah sewwa fl-ilma biex jitneħhew xi sustanzi li jinhallu fl-ilma, titghadda għal ftit fl-aċidu kromo-sulfuriku, tinħasel f'ilma distillat għal darbtejn sakemm tinkiseb reazzjoni newtrali u finalment tissaħħan ftit fuq fjamma tal-metanol.

Nota:

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

1.6.4.2.2. *Kalibrazzjoni ta' l-apparat*

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

Immuntar:

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

Aġġustament tal-punt żero:

Wara l-immuntar tal-holqa fuq l-apparat u qabel ma tkun mghaddsa fil-likwidu, l-indikazzjoni tat-*tensiometer* għandha tkun aġġustata għal żero u l-holqa ċekkjata għall-paralleliżmu mal-likwidu tas-superfiċje. Għal dan il-ghan, il-likwidu tas-superfiċje jista' jintuża bħala mera.

Kalibrazzjonijiet:

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

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

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

fejn:

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

m = il-piż tar-rikkieb (g)

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

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

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

▼ B

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

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

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

fejn:

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

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

1.6.4.3. *Preparazzjoni tal-kampjuni*

Soluzzjonijiet fl-ilma għandhom jithejjew mis-sustanzi li se jkunu ttestjati, bl-użu tal-koncentrazzjonijiet mehtieġa fl-ilma, u m'għandhomx jinkludu xi sustanzi li ma nhallux.

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

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

1.6.5. **Kondizzjonijiet tat-test**

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

1.6.6. **L-eżekuzzjoni tat-test**

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

▼B**2. DATA**

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

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

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

*Tabella***Korrezzjoni tat-tensjoni tas-superfiċje mkejla**

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

r	= 9,55 mm (raġġ medju tal-holqa)	
r	= 0,185 mm (raġġ medju tal-holqa)	
Valur Sperimentali (mN/m)	Valur Ikkoreġut (mN/m)	
	Kalibrazzjoni tal-piż (ara 1.6.4.2.2(a))	Kalibrazzjoni ta' l-ilma (ara 1.6.4.2.2(b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

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

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

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

$$\sigma = \frac{f_x F}{4\pi R}$$

fejn:

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

R = ir-raġġ tal-holqa

f = il-fattur ta' korrezzjoni (1)

3. RAPPORTAR

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

— il-metodu użat,

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

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

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

▼B

- il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni,
- it-temperatura tat-test,
- l-età tas-soluzzjoni użata; b'mod partikulari l-ħin bejn it-Preparazzjoni u l-kejl tas-soluzzjoni,
- id-deskrizzjoni tad-dipendenza fuq il-ħin tat-tensjoni tas-superfiċje wara t-trasferiment tas-soluzzjoni fir-reċipjent tal-kejl.
- l-informazzjoni u r-rimarki kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapportati, b'mod speċjali fir-rigward ta' l-impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

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

4. REFERENZI

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV
- (3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.
- (4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

▼ **M4****A.6. SOLUBILITÀ FL-ILMA****DAHLA**

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti ghal-Linja Gwida tat-Test (TG - Test Guideline) 105 (1995) tal-OECD. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa verżjoni riveduta tat-TG 105 originali li kienet adottata fl-1981. M'hemm l-ebda differenza sostanzjali bejn il-verżjoni prezenti 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 tinghata ftit informazzjoni preliminari dwar is-sustanza għall-ittestjar, bħall-formula strutturali, il-pessjoni 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 taht 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 mehtieg 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.

KIMIČI TA' REFERENZA

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

DESKRIZZJONI TAL-METODI**Kundizzjonijiet tat-test**

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

Test preliminari

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

▼ **M4**

minnu jibqgħu ma jinħallux, l-esperiment jitkompla f'cilindru tal-kejl ta' 100 ml. Is-solubilità approssimattiva tinsab fit-Tabella 1 hawn taht, skont dak il-volum ta' ilma li fih il-kampjun jinħall kompletament. Meta s-solubilità tkun baxxa, jista' jkun mehtiegħ hin 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 hin (sa 96 siegħa) u għandu isir attentat ta' aktar dilwizzjoni biex ikun aċċertat jekk għandux jintuza l-metodu ta' elużjoni tal-kolonna jew il-metodu tal-flixxun.

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*

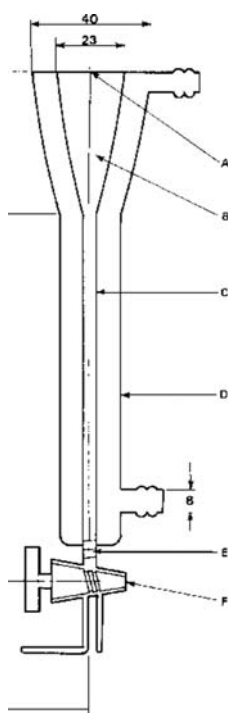
9. Dan il-metodu huwa bbażat fuq l-elużjoni tas-sustanza għall-ittestjar bl-ilma minn mikrokolonna li tkun mimlija b'materjal ta' rfid inert, li qabel kienet tkun inksiet b'eċċess ta' sustanza għall-ittestjar (2). Is-solubilità fl-ilma tingħata bil-konċentrazzjoni massa tas-sustanza tal-materjal ta'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

Apparat

10. L-apparat jikkonsisti f'mikrokolonna (Figura 1), miżmuma f'temperatura kostanti. Huwa mqabbd 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-ħġiegħ f'forma ta' fibri li jservi wkoll biex jiffiltra l-particelli l-barra. Materjali li possibbilment jistgħu jintużaw bhala rfid huma boċċi tal-ħġiegħ, 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 jipprovi għal hames volumi ta' ilma tal-qiegh (skartati fil-bidu tal-esperiment) u l-volum ta' hames kampjuni (mehudin għal analiżi matul l-esperiment). Alternattivament, id-daqs jista' jitnaqqas jekk ikun jista' jizdied l-ilma fis-sistema matul l-esperiment biex jiehu post il-hames volumi tal-qiegh inizjali mnehhija bl-impurità. Il-kolonna hijaa mqabbd b'tubu ta' materjal inert 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. Arrangament skematiku bl-użu ta' reċipjent ta' livellar jidher fil-Figura 3. F'dan l-arrangament il-mikrokolonna jitwawhhlilha rubinett tal-gheluq unidirezjonali. Il-konnessjoni mar-reċipjent ta' livellar tikkonsisti f'għonta tal-qiegh tal-ħġiegħ u tubu magħmul minn materjal inert. Ir-rata ta' fluss mir-reċipjent ta' livellar għandha tkun madwar 25 ml/h.

▼ M4

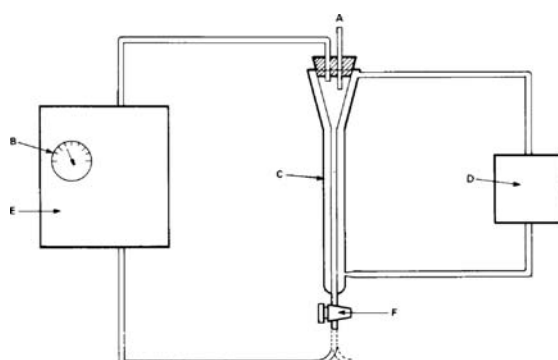
Figura 1



Dimensjonijet f mm

- A. Konnessjoni għal gonta tal-qiegħ tal-ħgieg
- B. Spazju ta' fuq
- C. Ġewwa 5
- D. Barra 19
- E. Tapp tal-ħgieg f'forma ta' fibri
- F. Rubinett tal-gheluq

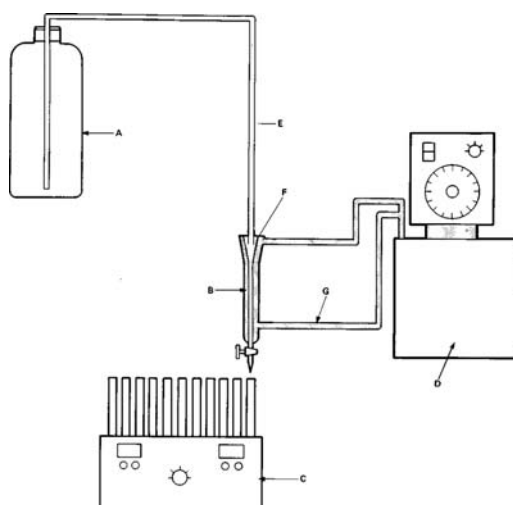
Figura 2



- 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 tehid ta' kampjuni

▼ **M4**

Figura 3



- A. Reċipjent ta' livellar (eż. flixkun kimiku ta' 2,5 litri)
 - B. Kolonna
 - C. Akkumulatur ta' frazzjoni
 - D. Termostat
 - E. Tubu tat-teflon
 - F. Ġonta tal-qiegh 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'qiegh tond. Ammont adattat ta' sustanza għall-ittestjar jinhall f'solvent volatili ta' kwalità ta' reagent analitiku u ammont li jixraq ta' din is-soluzzjoni jġidded 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 imhejji jitghaddas għal saghtejn f'madwar 5 ml ilma u s-sospensjoni titferra' fil-mikrokolonna. Alternattivament, jista' jittferra' materjal ta' rfid xott fil-mikrokolonna mimlija ilma u jithallew saghtejn 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 rrapportati.

Proċedura li tuża pompa ta' ċirkolazzjoni mill-gdid

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-qiegh għal kull siegħa għall-kolonna deskritta. Mill-anqas l-ewwel hames volumi ta' ilma tal-qiegh ikunu skartati biex jitnehhew l-impuritajiet li jinhallu fl-ilma. Wara dan, il-pompa tithalla taħdem sakemm ikun stabbilit ekwilibriju, kif iddefinit minn hames kampjuni suċċessivi li l-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jiddifferenzjawx b'aktar minn $\pm 30\%$ b'mod aleatorju. Dawn il-kampjuni għandhom ikunu sseparati wiehed mill-iehor b'intervalli ta' hin li jikkorrispondu mal-mogħdija ta' mill-anqas għaxar volumi ta' ilma tal-qiegh. Skont il-metodu analitiku li jintuża, jista' jkun preferibbli li tkun stabbilita kurva ta' konċentrazzjoni/hin biex turi li jkun intlaħaq ekwilibriju.

▼ M4*Proċedura li tuża reċipjent ta' livellar*

16. Frazzjonijiet suċċessivi ta' materjal ta' elużjoni għandhom jingabru u jiġu analizzati bil-metodu magħżul. Jintużaw frazzjonijiet mill-firxa tan-nofs tal-materjal ta' elużjoni, fejn il-konċentrazzjonijiet ikunu kostanti fi $\pm 30\%$ f'mill-anqas hames 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 oghla 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. Fiz-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' strixxex indikaturi speċjali.

Metodu tal-flixkun*Prinċipju*

21. Is-sustanza għall-ittestjar (is-solidi għandhom jintahnu) tinhall fl-ilma f'temperatura fit oghla mit-temperatura tat-test. Meta tinkiseb is-saturazzjoni, it-tahlita titkessa u tinzamm fit-temperatura tat-test. Alternattivament, u jekk ikun assigurat permezz tat-tehid adattat ta' kampjuni, li jkun intlaħaq l-ekwilibriju tas-saturazzjoni, il-kejl ikun jista' jitwettagħ direttament fit-temperatura tat-test. Sussegwentement il-konċentrazzjoni massa tas-sustanza għall-ittestjar fis-soluzzjoni fl-ilma, li m'għandhiex tinkludi xi partiċelli mhux mahlula, 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-termosta); 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. Tintiezen madwar hames darbiet aktar ta' dik il-kwantità f'kull wiehied mit-tliet reċipjenti tal-ħġieġ mghammra b'tappijiet tal-ħġieġ (eż. tubi ċentrifuga, fliexken). Jizdied 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 jċaqraq jew ihawwad li kapaċi jaħdem f'temperatura kostanti, eż. taħwid manjetiku f'banju tal-ilma bit-termosta. Wara ġurnata, wiehied mir-reċipjenti jitneħħa u jiġi ekwibrat għal 24 siegħa fit-temperatura tat-test b'ċaqliq okkazzjonali. Il-kontenuti

▼ **M4**

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. Iz-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 sodisfacenti. Jekk ir-riżultati mir-reċipjenti 1, 2 u 3 juru tendenza ta' valuri qed jiżdiedu, it-test kollu għandu jkun ripetut bl-użu ta' hinijiet ta' ekwilibrazzjoni itwal.

24. It-test jista' jitwettaq mingħajr inkubazzjoni minn qabel fi 30 °C. Bil-ghan li tkun stmata r-rata li biha jkun stabbilit l-ekwilibriju tas-saturazzjoni, jittiehdu kampjuni sakemm il-hin tat-thawwid ma jinfluwenzawx aktar il-konċentrazzjonijiet imkejla.
25. Il-pH ta' kull kampjun għandu jitkejjel, preferibbilment bl-użu ta' strixx indikaturi speċjali.

Determinazzjonijiet analitiċi

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

DEJTA U RAPPORTAR**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 hames 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 hames kampjuni mis-saturazzjoni kostanti għal kull prova;
- il-medja ta' mill-anqas żewġ provi suċċessivi;
- it-temperatura tal-ilma matul il-proċess ta' saturazzjoni;
- il-metodu ta' analiżi;
- in-natura tal-materjal ta' rfid;
- il-preparazzjoni tal-materjal ta' rfid;
- solvent użat;
- xhieda ta' kwalunkwe instabbiltà kimika tas-sustanza matul it-test;
- l-informazzjoni kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati, b'mod partikolari fir-rigward ta' impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza għall-ittestjar.

▼ M4*Metodu tal-flixxun*

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 flixxun;
- 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 (GU L 383, 29.12.1992, p. 113).
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use -Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility - Column elution method. 3)
- (3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use - Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility - Flask method.

▼B

A.8. KOEFFIĊJENT TAL-QSIM

1. METODU

Il-metodu “taċ-ċaqliq tal-flixxun” imfisser huwa bbazat fuq il-linja gwida tat-Test OECD (1).

1.1. DAHLA

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

Il-kejljiet għandhom jittiehdu fuq sustanzi jonizzabbli biss fil-forma mhux jonizzata tagħhom (aċidu hieles jew baži hielsa) prodotti bl-użu ta' sustanza adattata b'pH ta' mill-anqas unità pH taht (aċidu hieles) jew fuq (baži hielsa) il-pK.

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

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

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

▼B**1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA***Metodu taċ-ċaqliq tal-flixxun*

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

Metodu HPLC

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

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

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

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI**1.4.1. Metodu taċ-ċaqliq tal-flixxun**

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

1.4.2. Metodu HPLC

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

▼B

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

li fiha, t_r = huwa l-hin ta' retenzjoni tas-sustanza għat-test, u t_0 = il-hin medju li tehtiegħ molekula solventi biex tghaddi mill-kolonna (hin mejjet).

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

1.5.1. Ripetibilità

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixxun

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

Metodu HPLC

Bil-ghan li tikber il-fiduċja fil-kejl, jridu jsiru determinazzjonijiet duplikati. Il-valuri ta' log P mehuda minn kejl individwali għandhom jaqgħu fil-kamp ta' varjabbiltà ta' $\pm 0,1$ unitajiet logaritmiċi.

1.5.2. Sensittività

Metodu taċ-ċaqliq tal-flixxun

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

Metodu HPLC

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

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

▼B**1.5.3. Speċifika***Metodu ta' ċaqliq tal-flixxun*

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

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

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.6.1. Stima preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim**

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

1.6.2. Metodu ta' ċaqliq tal-flixxun**1.6.2.1. Preparazzjoni**

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

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

Nota:

M'għandux jintuza ilma direttament minn apparat li jbidel il-jone.

1.6.2.1.1. Pre-saturazzjoni tas-solventi

Qabel ma koeffiċjent tal-qsim jiġi ddeterminat, il-fażijiet tas-sistema tas-solvent jiġu reċiprokament saturati biċ-ċaqliq fit-temperatura ta' l-esperiment. Biex isir dan, hija haġa Prattika li ċċaqilaq żewġt ifliexken kbar bl-n-oktanol jew bl-ilma t-tnejn ta' purezza għolja bi kwantità suffiċjenti tas-solvent l-iehor fuq xejker mekkaniku għal 24 siegħa u mbagħad jithallew joqgħodu għal hin twil bizżejjed li jippermetti li l-fażijiet jisseparaw u jiksibu stat ta' saturazzjoni.

▼B**1.6.2.1.2. Preparazzjoni għat-test**

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

- il-valutazzjoni preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim (ara hawn fuq),
- il-kwantità minima tas-sustanza għat-test mehtieġa għall-proċedura analitika, u
- l-limitazzjoni tal-konċentrazzjoni massima għal kull fażi ta' 0,01 mol għal kull litru.

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

1.6.2.1.3. Is-sustanza għat-test

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

1.6.2.2. Kondizzjonijiet tat-test

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

1.6.2.3. Proċedura tal-kejl**1.6.2.3.1. Kisba ta' l-ekwilibriju tal-qsim**

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

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

1.6.2.3.2. Separazzjoni tal-fażi

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

▼B

1.6.2.4. *Analizi*

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

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

- il-metodi fotometriċi,
- il-kromatografija tal-gass,
- il-kromatografija likwida ta' rendiment għoli.

1.6.3. **Metodu HPLC**1.6.3.1. *Preparazzjoni**Apparat*

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

Faži mobbli

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

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

▼B

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

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

Sustanzi mahlula

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

Kondizzjonijiet tat-test

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

1.6.3.2. **Kejl***Kalkolu tal-ħin mejjet t_o*

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

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

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

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

▼B

Graff ta' kalibrazzjoni

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

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

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

2. **DATA***Metodu taċ-ċaqliq tal-flixxun*

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

3. **RAPPURTAR**

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

- l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet),
- meta l-metodi ma japplikawx (eż. materjal attiv fuq is-superfiċje), għandhom ikun pprovdut valur ikkalkulat jew stima bbażat/a fuq is-solubilitajiet individwali fl-n-oktanol u fl-ilma,
- l-informazzjoni u r-rimarki kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapportati, b'mod speċjali fir-rigward ta' l-impuritajiet u l-istat fiżiku tas-sustanza.

Għall-metodu taċ-ċaqliq tal-flixxun:

- ir-riżultat ta' l-istima preliminari, jekk ikun hemm,
- it-temperatura tad-determinazzjoni,
- id-DATA dwar il-proċeduri analitiċi użati fid-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet,
- il-hin u l-veloċità taċ-ċentrifugazzjoni, jekk użata,

▼B

- il-konċentrazzjonijiet imkejla biż-żewġ fażijiet għal kull determinazzjoni (dan ifisser li total ta' 12-il konċentrazzjoni jiġu rrapportati),
- il-piż tas-sustanza għat-test, il-volum ta' kull fażi użata f'kull reċipjent tat-test u l-ammont totali kkalkulat ta' sustanza għat-test preżenti f'kull fażi wara l-ekwilibrizzjoni,
- il-valuri kkalkulati tal-koeffiċjent tal-qsim (P) u l-medja għandhom ikunu rrapportati għal kull sett ta' kondizzjonijiet tat-test kif għandu jsir ukoll għall-medja tad-determinazzjonijiet kollha. Jekk hemm suspett ta' dipendenza tal-konċentrazzjoni fuq il-koeffiċjent tal-qsim, dan għandu jkun imnizzel fir-rapport,
- id-devjazzjoni standard tal-valuri individwali P madwar il-medja tagħhom għandha tkun rrapportata,
- il-valur medju P tad-determinazzjonijiet kollha għandu jkun espress ukoll bħala logartimu tiegħu stess (bażi 10),
- il- P_{ow} teoretiku kkalkulat meta dan il-valur gie ddeterminat jew meta l-valur imkejjel huwa $> 10^4$,
- il-pH ta' l-ilma użat u tal-faży fl-ilma matul l-esperiment,
- jekk jintużaw protezzjonijiet, ġustifikazzjoni għall-użu tal-protezzjonijiet flok l-ilma, il-kompożizzjoni, il-konċentrazzjoni u l-pH tal-protezzjonijiet, il-pH tal-faży fl-ilma qabel u wara l-esperiment.

Metodu HPLC:

- ir-riżultat ta' l-istima preliminari, jekk ikun hemm,
- is-sustanza għat-test u ta' referenza u l-purità tagħhom,
- l-iskala tat-temperatura tad-determinazzjonijiet,
- il-pH li fih isiru d-determinazzjonijiet,
- id-dettalji tal-kolonna analitika u ta' protezzjoni, tal-faży mobbli u tal-mezzi tat-tiftix,
- id-DATA ta' retenzjoni u l-valuri tal-log P fil-letteratura għall-komposti ta' referenza użati fil-kalibrizzjoni,
- id-dettalji tal-linja ta' rigressjoni riżultanti (log K kontra log P),
- id-DATA ta' retenzjoni medja u l-valur interpolat ta' log P għall-kompost għat-test,
- id-deskrizzjoni tat-tagħmir u l-kondizzjonijiet operattivi,
- il-profil ta' l-elużjoni,
- il-kwantitajiet ta' sustanzi għat-test u ta' referenza mdahhla fil-kolonna,
- il-hin mejjet u kif tkejjel.

▼B

4.

REFERENZI

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.
- (3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) -Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
- (5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).
- (6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
- (7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.
- (8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675
- (9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787
- (10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E.Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223–339.
- (11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479
- (12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- (14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use -Determination of partition coefficient -Flask shaking method.
- (15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459
- (16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525
- (17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.
- (18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.
- (19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382
- (20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

- (21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984,
- (22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base11978.
- (23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B*Appendiċi 1***Metodi ta' stima/kalkolu****DAHLA**

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

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

- biex ikun deċiż liema mill-metodi sperimentali huma adattati (skala taċ-ċaqliq tal-flixxkun: $\log P_{ow}$: minn - 2 sa 4, skala HPLC: $\log P_{ow}$: minn 0 sa 6),
- għall-għażla tal-kondizzjonijiet għat-test adattati (eż. sustanzi ta' referenza għal proċeduri HPLC, proporzjon tal-volum n-oktanol/ilma għall-metodu taċ-ċaqliq tal-flixxkun),
- bhala verifika interna tal-laboratorju ta' żbalji sperimentali possibbli,
- għall-għoti ta' stima ta' P_{ow} - f'każijiet fejn il-metodi sperimentali ma jistgħux jiġu applikati għal raġunijiet tekniċi.

METODU TA' STIMA

Stima preliminari tal-koeffiċjent tal-qsim

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

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

METODI TA' KALKOLU

Prinċipju tal-Metodi ta' Kalkolu

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

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

Kriterji ta' kwalità

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

▼B**Proċedura ta' kalkolu***Il-metodu Hansch π -*

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

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

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

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

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

Metodu Rekker

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

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

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

Il-metodu Hansch-Leo

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

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

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

Metodu Kombinat

Il-kalkolu tal- $\log P_{ow}$ tal-molekuli kompleksi tista' titgħieb konsiderevolment, jekk il-molekula tiġi tinqasam f'substrutturi akbar li għalihom hemm disponibbli valuri affidabbli tal- $\log P_{ow}$ jew mit-tabelli (b)(c) jew mill-kejl li wiehed jagħmel. Frammenti bħal dawn (eż.. eteroċikli, antrakina, azobenzin) jistgħu mbağħad jiġu kkombinati mal-valuri Hansch π jew mal-kostanti tal-frammenti Rekker jew Leo.

Rimarki

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

▼B

- ii) Jekk wiehed jassumi li hemm rabtiet idroġeni intramolekulari, it-termini ta' korrezzjoni korrispondenti (approssimattivament unitajiet + 0,6 to + 1,0 log P_{ow}) jridu jiġu miżjuda (a). Indikazzjoni tal-preżenza ta' rabtiet bħal dawn jistgħu jinkisbu mill-mudelli tridimensjonali jew mid-DATA spettroskopika tal-molekula.
- iii) Jekk huma possibbli bosta forum tawtomeriċi, l-aktar forma probabbli għandha tintuża bħala bażi għall-kalkolu.
- iv) Ir-reviżjonijiet tal-listi tal-kostanti tal-frammenti għandhom jkunu segwiti bl-attenzjoni kollha.

Rapport

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

- id-deskrizzjoni tas-sustanza (identità, impuritajiet, eċċ.),
- l-indikazzjoni ta' kwalunkwe rabta idroġena intramolekulari possibbli, dissoċjazzjoni, taċ-ċarġ u kwalunkwe effett mhux tas-soltu ieħor (eż.. tawtomeriżmu),
- id-deskrizzjoni tal-metodu ta' kalkolu,
- l-identifikazzjoni jew il-provvista ta' *database*,
- il-pekularitajiet fil-ġhażla tal-frammenti,
- id-dokumentazzjoni komprensiva tal-kalkolu.

LETTERATURA

- (a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.
- (b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71,525.
- (e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, vol. 14,479.
- (f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86,5175.
- (g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochimistry Library, Elsevier, New York, 1977,vol.1.
- (h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12,1459.
- (i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.


Appendici 2
Sustanzi ta' Referenza Rakkomandati ghal Metodu HPLC

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

▼ B

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

▼B**A.9. IL-PUNT TA' FJAMMABILITÀ****1. METODU****1.1. DAHLA**

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

Unitajiet: °C

$$t = T - 273,15$$

(t f° °C u T f°K)

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ**1.5.1. Ripetibilità**

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

1.5.2. Sensittività

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

1.5.3. Speċifità

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

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Preparazzjonijiet**

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

Għas-sikurezza, huwa rakkomandat li metodu li jutilizza daqs żgħir ta' kampjun, circa 2 cm³, jintuża għal sustanzi enerġetiċi jew tossiċi.

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

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

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**1.6.3.1. *Metodu ta' l-ekwilibriju*

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

1.6.3.2. *Metodu ta' non-ekwilibriju*

Apparat Abel:

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

Apparat Abel-Pensky:

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

Apparat Tag:

Ara ASTM D 56.

Apparat Pensky-Martens:

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

Rimarki:

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

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

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

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

▼B**2. DATA****3. RAPPORTAR**

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

- l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identità u impuritajiet),
- il-metodu użat għandu jkun dikjarat kif ukoll xi devjazzjonijiet possibbli,
- ir-riżultati u xi rimarki addizzjonali rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. REFERENZI

Xejn.

▼B**A.10. FJAMMABILITÀ (SOLIDI)****1. METODU****1.1. DAHLA**

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

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

Bil-ghan li ma jiġux inkluzi s-sustanzi kollha li jistgħu jinxtegħlu imma daww biss li jinharqu malajr jew daww li l-imġiba tal-ħruq tagħhom hija fi kwalunkwe mod speċjalment perikoluża, sustanzi li l-veloċità tal-ħruq tagħhom taqbez ċertu valur ta' limitu biss huma kkunsidrati bħala fjamabbli ħafna.

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

1.2. TIFSIRA U UNITAJIET

Il-hin tal-ħruq huwa muri f'sekondi.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.4. PRINĊIPJU TAL-METOD

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. Test preliminari ta' orjentazzjoni

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

1.6.2. It-test tar-rata ta' fjammabilità

1.6.2.1. Preparazzjoni

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

Sustanzi bħall-pejst jiġu mdellka fuq pjanċa tal-baži mhux kombustibbli, mhux poruża u b'konduċibilità ta' shana baxxa fil-forma ta' habel 250 mm fit-tul b'sezzjoni trasversali ta' madwar 1 cm².

1.6.2.2. Kondizzjonijiet tat-test

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

1.6.2.3. L-eżekuzzjoni tat-test

Irranga l-gozz f'kurrent ta' arja f'armarju li jiġbed id-duħhan.

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

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

▼B

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

2. **DATA**

Il-hin tal-hruq mit-test ta' orjentazzjoni preliminari (1.6.1.) u l-inqas hin ta' hruq sa sitt testijiet (1.6.2.3.) huma rilevanti għall-valutazzjoni.

3. **RAPPURTAR**

3.1. **RAPPORT TAT-TEST**

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

- l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impuritajiet),
- id-deskrizzjoni tas-sustanza għat-test, l-istat fiziku tagħha inkluż il-kontenut ta' l-umdità,
- ir-riżultati mit-testijiet ta' orjentazzjoni preliminari u mit-test tar-rata ta' hruq jekk ikunu saru,
- ir-rimarki addizzjonali kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

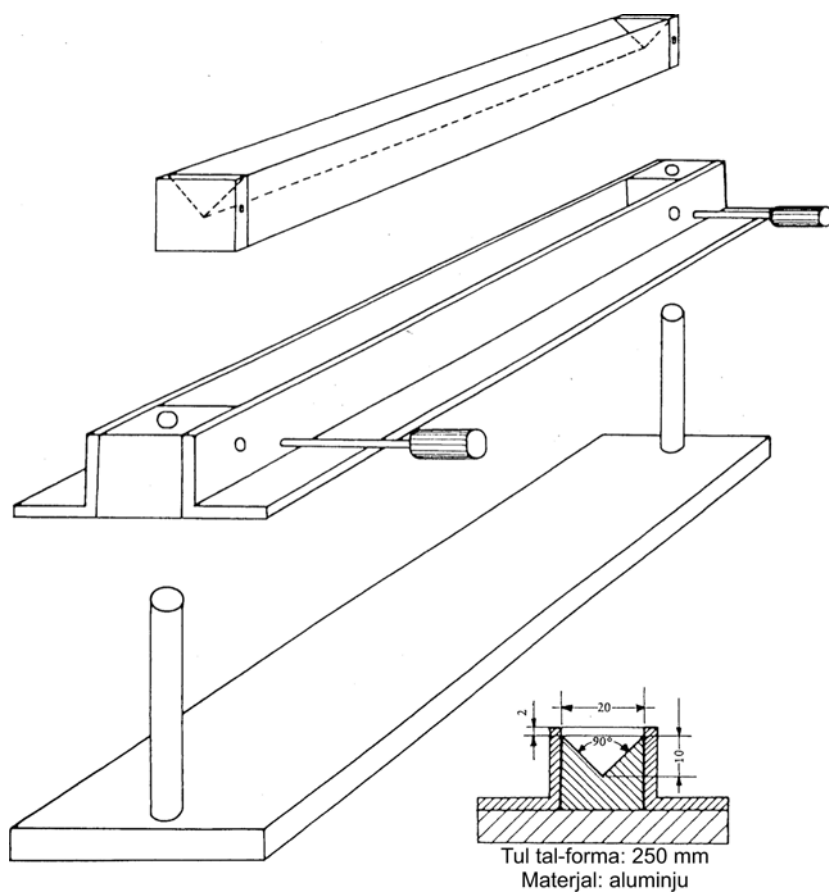
Sustanzi f'forma ta' trab, imrammla jew bħall-pejst għandhom jiġu kkunsidrati bħala f'jammabbli hafna meta l-hin tal-hruq fi kwalunkwe test skond il-proċedura tat-test mfisser f'1.6.2 huwa inqas minn 45 sekonda. Trabijiet tal-metall u liegi tal-metall huma kkunsidrati bħala f'jammabbli hafna meta huma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

4. **REFERENZI**

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

▼B*Appendiċi**Figura***Forom u aċċessorji għall-preparazzjoni tal-gożż**

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



▼B**A.11. FJAMMABILITÀ (GASSIJET)****1. METODU****1.1. DAHLA**

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

1.2. TIFSIRA U UNITAJIET

L-iskala ta' f'ammabilità hija l-iskala ta' konċentrazzjoni bejn l-inqas u l-ogħla limiti ta' splużjoni. L-inqas u l-ogħla limiti ta' splużjoni huma daww il-limiti ta' konċentrazzjoni ta' gass f'ammabbli mhallat ma' l-arja li fih ma ssehhx propagazzjoni tal-fjamma.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.6.1. Apparat**

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

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

1.6.2. Kondizzjonijiet tat-test

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

▼B**1.6.3. L-eżekuzzjoni tat-test**

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

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

2. DATA

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

3. RAPPORTAR

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

- l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impurità),
- deskrizzjoni, bid-dimensjonijiet, ta' l-apparat użat,
- it-temperatura li fiha twettaq it-test,
- il-konċentrazzjonijiet ippruvati u r-riżultati miksuba,
- ir-riżultat tat-test: gass mhux fjammabbli jew gass fjammabbli ħafna,
- jekk ikun konkluz li l-gass mhuwiex fjammabbli allura l-iskala ta' konċentrazzjoni li fuqha kien ippruvat fi stadji ta' 1 % għandha tkun iddikjarata,
- ir-rimarki addizzjonali kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu rrapurtati.

4. REFERENZI

- (1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.
- (2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse- einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vo156, 2, 126-127.Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. 'Entwicklung

▼B**A.12. FJAMMABILITÀ (KUNTATT MA' L-ILMA)****1. METODU****1.1. DAHLA**

Dan il-metodu ta' test jista' jintuza biex ikun iddeterminat jekk ir-reazzjoni ta' sustanza ma' l-ilma jew l-arja umda twassalx għall-iżvilupp ta' ammonti perikolużi ta' gass jew gassijiet li jistghu jkunu f'ammabbli hafna.

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

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

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

1.3.1. Pass 1

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

1.3.2. Pass 2

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

1.3.2. Pass 3

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

1.3.4. Pass 4

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

▼B

1.4. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1. **Pass 1**1.6.1.1. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.1.2. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

1.6.2. **Pass 2**1.6.2.1. *Apparat*

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

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

1.6.3. **Pass 3**1.6.3.1. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

1.6.3.2. *L-eżekuzzjoni tat-test*

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

▼B**1.6.4. Pass 4****1.6.4.1. Apparatus**

L-apparat jiġi mmuntat kif jidher fil-figura.

1.6.4.2. Kondizzjonijiet tat-test

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

1.6.4.3. L-eżekuzzjoni tat-test

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

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

2. DATA

Is-sustanza titqies li hija perikoluża jekk:

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

jew

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

3. RAPPORTAR

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

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

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

▼B

- ir-riżultati tat-testijiet (passi 1, 2, 3 u 4),
- l-identità kimika tal-gass evolut,
- ir-rata ta' evoluzzjoni ta' gass jekk pass 4 (1.6.4) jitwettaq,
- kwalunkwe rimarki rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4.

REFERENZI

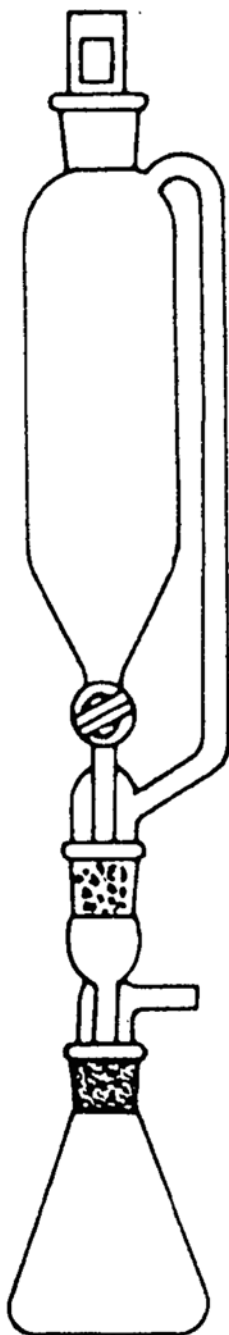
- (1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
- (2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Appendiċi

Figura

Apparat



▼B**A.13. PROPRJETAJIET PIROFORIČI TA' SOLIDI U LIKWIDI****1. METODU****1.1. DAHLA**

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

Sustanzi li jehtieg li jkunu esposti għall-arja għal sigħat jew granet f'temperatura ambjentali jew f'temperaturi elevati qabel ma ssehh il-fjammabilità mhumex koperti b'dan il-metodu ta' test.

1.2 TIFSIRIET U UNITAJIET

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

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

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Mhux speċifikati.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

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

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TEST**1.6.1. Apparat**

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

Nota:

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

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

▼B**1.6.2. L-eżekuzzjoni tat-test****a) Solidi trab**

Minn 1 sa 2 cm³ mis-sustanza għat-test jitferraw minn għoli ta' circa 1 m fuq superfiċje mhux kombustibbli u jiġi osservat jekk is-sustanza taqbadx matul it-tferriġ jew fi żmien hames minuti wara li toqghod.

It-test jitwettagħ sitt darbiet kemm-il darba ma ssehhx il-fjammabilità.

b) Likwidi

Madwar 5 cm³ mil-likwidu għat-test jitferra' f'kapsula tal-porċellana mhejjija u jiġi osservat jekk is-sustanza taqbadx fi żmien hames minuti.

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

Kampjun ta' 0,5 mm jintefa' permezz ta' siringa fuq karta filtru bit-tarf f'forma ta' serrieq u jiġi osservat jekk issehhx fjammabilità jew hruq sakemm titfahham il-karta filtru fi żmien hames minuti li jizdied il-likwidu. It-test jitwettagħ tliet darbiet kemm-il darba ma ssehhx il-fjammabilità u t-tfahhim.

2. DATA**2.1. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

It-test jista' jitwaqqaf hekk kif issehhx riżultat pożittiv f'xi wiehed mit-testijiet.

2.2. VALUTAZZJONI

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

3. RAPPORTAR

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

- l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impurità),
- ir-riżultat tat-test,
- kwalunkwe rimarka rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. REFERENZI

- (1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.
- (2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B**A.14. PROPRJETAJIET ESPLOŽIVI****1. METODU****1.1. DAHLA**

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

Il-metodu fih tliet partijiet:

- (a) test ta' sensittività termika (1);
- (b) test ta' sensittività mekkanika fir-rigward ta' xokk (1);
- (c) test ta' sensittività mekkanika fir-rigward ta' frizzjoni (1).

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

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

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

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Esplożiv:

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

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

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

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

▼B**1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU**

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

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

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

1.4.2. Sensittività termika

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

1.4.3. Sensittività mekkanika (xokk)

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

1.4.4. Sensittività mekkanika (frizzjoni)

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

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Mhux definiti.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.6.1. Sensittività termika (effett ta' fjamma)****1.6.1.1. Apparati**

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

▼B

1.6.1.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

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

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

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

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

1.6.1.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet*

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

▼B

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

1.6.1.4. *Valutazzjoni*

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

1.6.2. **Sensittività mekkanika (xokk)**1.6.2.1. *Apparat (figura 4)*

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

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

1.6.2.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

Il-volum tal-kampjun irid ikun 40 mm³, jew volum li huwa adattat ma' kwalunkwe apparat alternattiv. Sustanzi solidi għandhom ikunu ppruvati fi stat niexef u mhejjija kif ġej:

- (a) sustanzi mfarrka jiġu mġharbula (daqs tat-toqba ta' l-għarbiel 0,5 mm); dak kollu li jgħaddi mill-għarbiel jintuża għat-test;
- (b) sustanzi ppressati, fonduti jew altrimenti kondensati jiġu mkissra fi bċejjeċ żgħar u mġharbula; il-frazzjoni mġharbula minn 0,5 sa 1 mm dijametru tintuża għat-test u għandha tkun rappreżentattiva tas-sustanza originali.

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

▼B**1.6.2.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet***

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

1.6.2.4. *Valutazzjoni*

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

1.6.3. *Sensittività mekkanika (frizzjoni)***1.6.3.1. *Apparat (figura 5)***

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

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

1.6.3.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

Il-volum tal-kampjun irid ikun ta' 10 mm³, jew volum li huwa adattat għal kwalunkwe apparat alternattiv.

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

- (a) sustanzi mfarrka jiġu mgħarbula (daqs tat-toqba ta' l-għarbiel 0,5 mm); dak kollu li jgħaddi mill-għarbiel jintuża għat-test;
- (b) sustanzi ppressati, fonduti jew altrimenti kkondensati jiġu mkissra fi bċejjeċ żgħar u mgħarbula; il-frazzjoni mgħarbula ta' < 0,5 mm dijametru tintuża għat-test.

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

▼B**1.6.3.3. *L-eżekuzzjoni tat-testijiet***

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

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

1.6.3.4. *Valutazzjoni*

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

2. DATA

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

3. RAPPORTAR**3.1. RAPPORT TAT-TEST**

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

- identità, kompozizzjoni, purità, kontenut ta' umdità eċċ. tas-sustanza ttestjata.
- il-forma fiżika tal-kampjun u jekk kienx imfarrak, miksur u/jew mġharbul,
- l-osservazzjonijiet matul it-testijiet għas-sensittività termika (eż. piż b'kampjun, numru ta' frammenti eċċ.),
- l-osservazzjonijiet matul it-testijiet għas-sensittività mekkanika (eż. il-formazzjoni ta' ammonti konsiderevoli ta' duħħan jew dekompozizzjoni kompleta mingħajr rapport, fjammi, sparks, rapport, tifqigh eċċ.),
- ir-riżultati ta' kull test,
- jekk intuża apparat alternattiv, trid tingħata ġustifikazzjoni alternattiva kif ukoll xhieda ta' korelazzjoni bejn riżultati miksuba b'apparat speċifiku u dawk miksuba b'apparat ekwivalenti,

▼B

- kwalunkwe kummenti utli bhal referenza għal testijiet bi prodotti simili li jistgħu jkunu rilevanti għall-interpretazzjoni proprja tar-riżultati,
- ir-rimarki addizzjonali kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. **INTERPRETAZZJONI U VALUTAZZJONI TA' RIŻULTATI**

Ir-rapport tat-test irid isemmi kwalunkwe riżultati li huma kkunsidrati foloz, anomali jew mhux rappreżentattivi. Jekk xi wiehed mir-riżultati għandu jitwarrab, għandha tinghata spjegazzjoni u r-riżultati ta' l-ittestjar supplimentari. Sakemm riżultat anomalu ma jkunx spjegat, irid ikun aċċettat skond l-apparenza u użat biex tkun ikklassifikata s-sustanza skond il-każ.

4. **REFERENZI**

- (1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
- (2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.
- (3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.
- (4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use -Determination of explosion risk.

▼B

Appendiċi

Eżempju ta' speċifikazzjoni ta' materjal għal test ta' sensitività termika (ara DIN 1623)

- (1) Tubu: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.0336.505 g
- (2) Pjanċa mhaffra: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.4873
- (3) Il-vit fil-kamin u l-iskorfina: Speċifikazzjoni tal-materjal Nru 1.3817

Figura 1

Apparat għat-test tas-sensittività termika

(d-dimensjonijiet kollha f'millimetri)

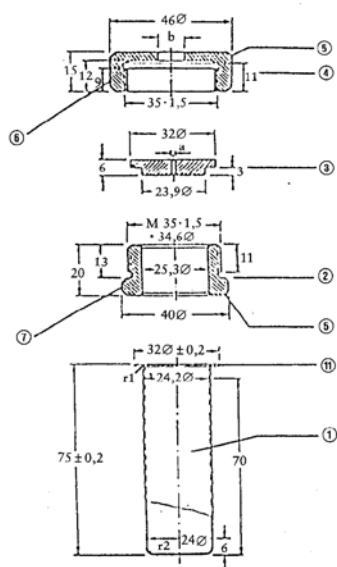


Fig. 1a Tubu ta' l-azzar u aċċessorji

- (1) tubu
- (1a) flanġ ta' barra
- (2) vit bil-kamin; hajta bi frzzjoni żgħira
- (3) pjanċa miftuħa a = dijametru ta' 2.0 jew 6.0 mm
- (4) skorfina b = dijametru 10 mm
- (5) superficje ċanfrin
- (6) 2 flat għal spanner qies 41

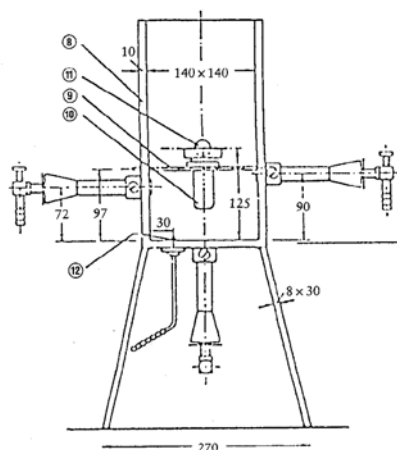
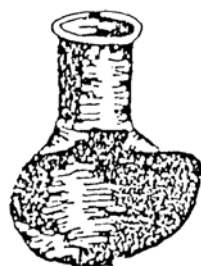


Fig. 1b Apparat ta' tishin u protettiv

- (7) 2 flat għal spanner qies 36
- (8) kaxxa li ma tinkisix
- (9) 2 vireg ta' rfid għat-tubu
- (10) tubu mmuntat
- (11) pożizzjoni għall-berner ta' wara; il-berners l-oħra jidhru
- (12) merżuq pilota

▼B*Figura 2***Test tas-sensittività termika**

(eżempju ta' frammentazzjoni)



Ebda splużjoni



Ebda splużjoni



Splużjoni



Splużjoni



Splużjoni

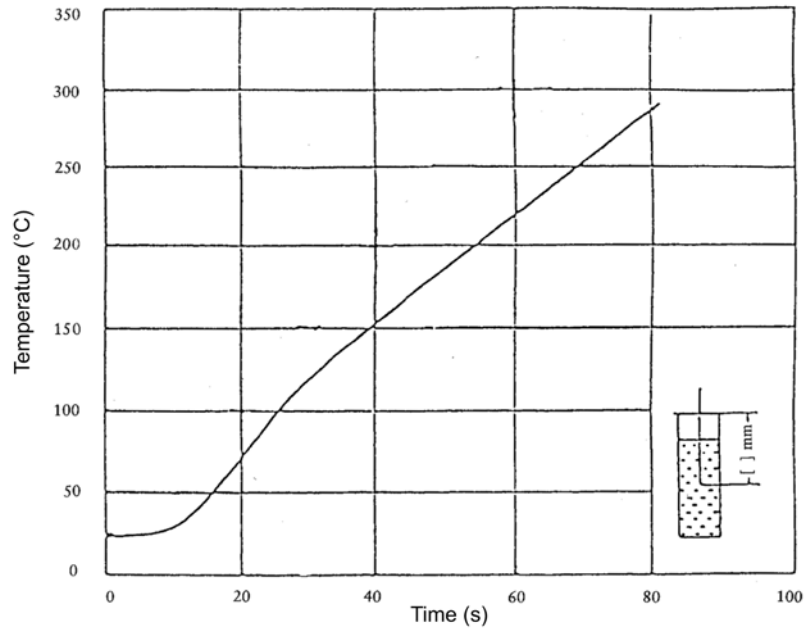


Splużjoni

▼ B

Figura 3

Il-kalibrazzjoni tar-rata ta' tishin għat-test tas-sensittività termika



Il-kurvatura tat-temperatura/hin miksuba bit-tishin ta' *dibutyl phtalate* (27 cm^3) ftubu maghluq (1,5 mm pjanċa mhaffra) bl-użu ta' rata ta' fluss tal-propan ta' 3,2 litru/minuta. It-temperatura tiġi mkejla b'termokoppja ta' azzar li ma jissaddadx miksi b'*chromel/alumel* ta' 1mm dijametru, impoġġija fiċ-ċentru 43 mm taht ix-xifer tat-tubu. Ir-rata tat-tishin bejn 135°C u 285°C għandha tkun bejn 185 u 215 K/minuta.

▼B

Figura 4

Apparat għat-test bix-xokk

(i-dimensjonijiet huma kollha f'millimetri)

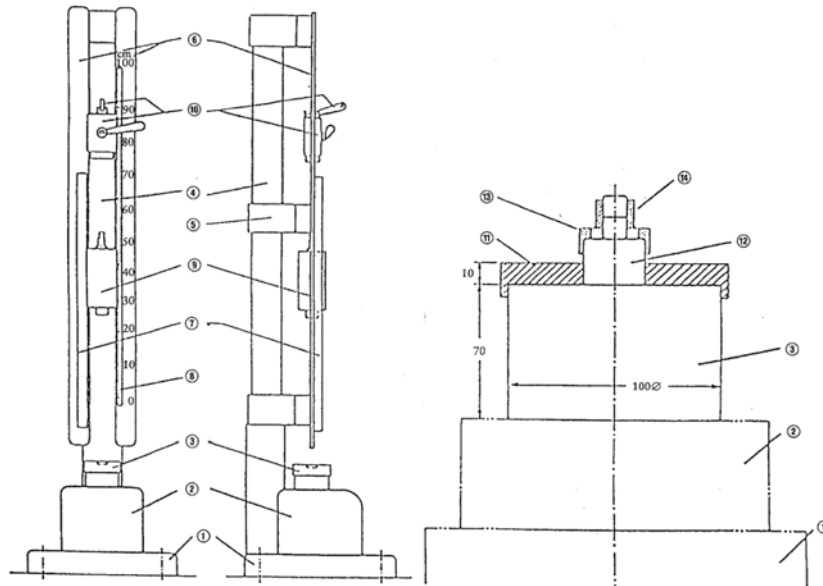


Fig 4a martell li jaqa', id-dehra ġenerali ta' quddiem u tal-ġenb

- (1) bażi, 450 x 450 x 60
- (2) blokk ta' l-azzar, 230 x 250 x 200
- (3) inkwina, 100 dijametru x 70
- (4) kolonna
- (5) angolu li jsaħħaħ medjan
- (6) 2 gwidi
- (7) ingranaġġ bis-snien

Fig 4b Martell li jaqa', il-parti t'isfel

- (8) skala ggradata
- (9) martell li jaqa' (piż li jaqa')
- (10) apparat li jżomm u jehles
- (11) pjanta li torbot
- (12) inkwina intermedjarja (li tinbidel), 26 dijametru x 26
- (13) holqa li torbot bit-toqob
- (14) apparat għall-impatt

▼B

Figura 4

Kontinwazzjoni

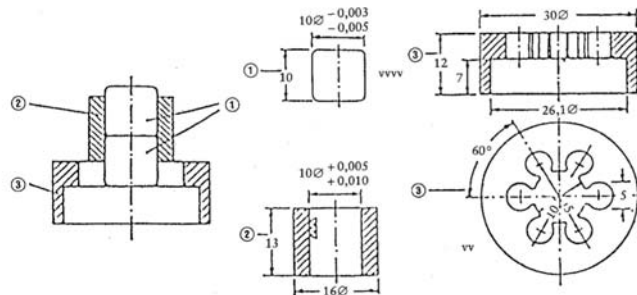


Fig. 4c Apparat tax-xokk għal sustanzi forma ta' trab jew pejst

Fig 4d. Apparat tax-xokk għal sustanzi likwidi

- (1) ċilindri ta' l-azzar
- (2) holqa gwida għaċ-ċilindri ta' l-azzar
- (3) holqa li torbot b'fethiet
 - (a) taqsima vertikali
 - (b) pjan
- (4) holqa tal-lastiku
- (5) sustanza likwida (40 mm³)
- (6) space free from liquid

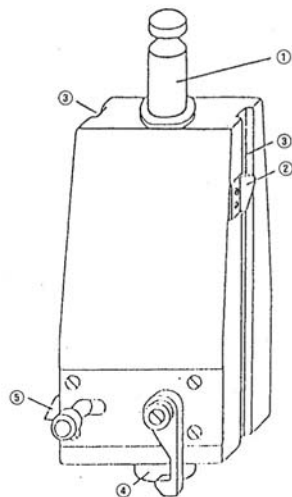
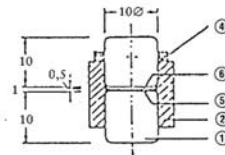


Fig. 4e Martell (piż li jaqa' ta' 5 kg)

- (1) plagg għas-sospensjoni
- (2) werrej ta' l-għoli
- (3) groove għall-pożizzjoni
- (4) ras ċilindrika għad-daqqa
- (5) molla li treġġa' lura

▼ B

Figura 5

Apparat għas-sensittività tal-frizzjoni.

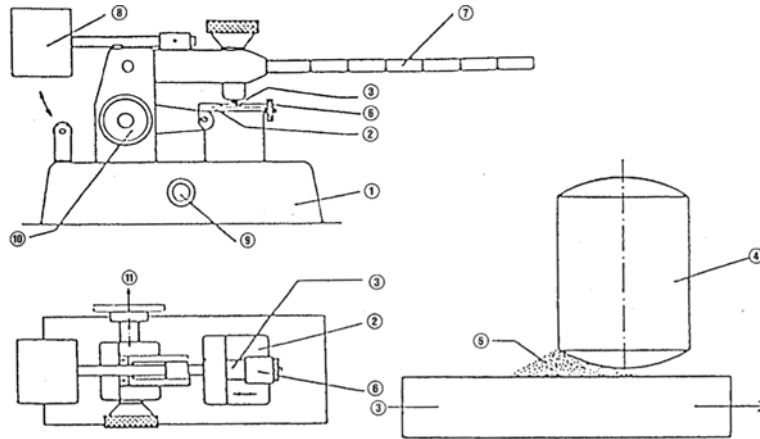


Fig 5a. Apparat ta'frizzjoni; elevazzjoni u veduta mill-ġenb

- (1) bażi ta' l-azzar
- (2) kerig li terfa' u timxi
- (3) pjanta tal-porcellana, 25 × 25 × 5 mm fuq il-kerig
- (4) cilindru fiss tal-porcellana 10 dijametru × 15 mm

Fig 5b Pożizzjoni tal-bidu tač-čilindru fuq il-kampjun

- (5) il-kampjun għat-test, approssimattivament 10 mm³
- (6) apparat li jżomm ič-čilindru
- (7) driegħ li jgħafas
- (8) kontrapiz
- (9) swiċċ
- (10) rota biex tissettja l-kerig fil-pożizzjoni tal-bidu
- (11) direzzjoni lejn il-mutur ta' l-elettriku

▼B**A.15. TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ (LIKWIDI U GASSIJET)****1. METODU****1.1. DAHLA**

Sustanzi esplożivi u sustanzi li jaqbd u spontanjament f'kontatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali m'ghandhomx ikunu sottomessi għal dan it-test. Il-proċedura tat-test hija applikabbli għal gassijiet, likwidi u fwawar li, fil-preżenza ta' l-arja, jistgħu jitqabbdu b'superfiċje shuna.

It-temperatura ta' l-awto-fjammabilità tista' titqies imnaqqsa b'mod konsiderevoli bil-preżenza ta' impuritajiet katalitiċi, b'materjal tas-superfiċje u b'volum akbar tar-reċipjent tat-test.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Il-grad ta' l-awto-fjammabilità huwa espress f'termini ta' temperatura ta' awto-fjammabilità. It-temperatura ta' l-awto-fjammabilità hija l-inqas temperatura li fiha s-sustanza għat-test taqbad meta mhallta ma' l-arja taht kondizzjonijiet imfissra fil-metodu tat-test.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza huma ċitati fl-istandards (ara 1.6.3.). Huma għandhom iservu primarjament biex jiċċekkjaw ir-rendiment tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu tqabbil ma' riżultati minn metodi oħra.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Il-metodu jiddetermina t-temperatura minima tal-qoxra ta' ġewwa ta' reċipjent magħluq li tirriżulta fil-fjammabilità ta' gass, fwar jew likwidu injettat fir-reċipjent.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibbiltà tvarja skond l-iskala ta' l-awto-fjammabilità u l-metodu tat-test użat.

Is-sensittività u l-ispeċifità jiddependu fuq il-metodu tat-test użat.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.6.1. Apparat**

L-apparat huwa mfisser fil-metodu riferut f'1.6.3.

1.6.2. Kondizzjonijiet tat-test

Kampjun tas-sustanza tat-test jiġi ttestjat skond il-metodu msemmi f'1.6.3.

1.6.3. L-eżekuzzjoni tat-test

Ara IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

▼B**2. DATA**

Irreġistra t-temperatura tat-test, il-pressjoni atmosferika, il-kwantità użata mill-kampjun u l-intervall ta' hin sakemm issir il-fjammabilità.

3. RAPPORTAR

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

- l-ispeċifikazzjoni preċiża tas-sustanza (identifikazzjoni u impuritajiet),
- il-kwantità ta' kampjun użata, il-pressjoni atmosferika,
- l-apparat użat,
- ir-riżultat tal-kejl (temperaturi tat-test, riżultati li jirrigwardaw il-fjammabilità, u l-intervalli ta' hin korrispondenti),
- ir-rimarki addizzjonali kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. REFERENZI

Xejn.

▼B**A.16. TEMPERATURA TA' AWTO-FJAMMABILITÀ RELATTIVA GHAL SOLIDI****1. METODU****1.1 DAHLA**

Sustanzi esplożivi u sustanzi li jaqbd spontanjament f'kuntatt ma' l-arja f'temperatura ambjentali m'ghandhomx ikunu sottomessi ghal dan it-test.

L-ghan ta' dan it-test huwa li jipprovdi informazzjoni preliminari dwar l-awto-fjammabilità ta' sustanzi solidi f'temperaturi elevati.

Jekk is-shana li tiżviluppa jew b'reazzjoni tas-sustanza ma' l-ossigenu jew b'dekompożizzjoni eżotermika ma tintilifx malajr biżżejjed fil-madwar, issehh awto-tishin li jwassal għall-awto-fjammabilità. Awto-fjammabilità għalhekk issehh meta r-rata ta' produzzjoni tas-shana taqbez ir-rata tat-telf tas-shana.

Il-proċedura tat-test hija utli bħala test ta' skrinjar preliminari għal sustanzi solidi. Minhabba n-natura komplessa tal-fjammabilità u l-kombustjoni ta' solidi, it-temperatura ta' l-awto-fjammabilità ddeterminata skond dan il-metodu ta' test għandha tintuża għal għanijiet ta' tqabbil biss.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

It-temperatura ta' awto-fjammabilità kif miksuba b'dan il-metodu hija t-temperatura ambjentali minima espressa f' °C li fiha ċertu volum ta' sustanza jaqbad taht kondizzjonijiet definiti.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Ċertu volum tas-sustanza għat-test jitpoġġa f'form f'temperatura ambjentali; il-kurva tat-temperatura/hin relatata mal-kondizzjonijiet f'nofs il-kampjun tiġi rreġistrata waqt li t-temperatura tal-form tiżdied sa 400 °C, jew sal-punt tat-tidwib jekk dan huwa iżgħar, b'rata ta' 0,5 °C/min. Għall-ghan ta' dan it-test, it-temperatura tal-form li fiha t-temperatura tal-kampjun tilhaq 400 °C b'awto-tishin tissegjah it-temperatura ta' l-awto-fjammabilità.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.6.1. Apparat****1.6.1.1. Forn**

Forn tal-laboratorju pprogrammat b'temperatura (volum ta' madwar 2 litri) mghammar b'ċirkolazzjoni ta' l-arja naturali u bi sfog għal splużjoni. Bil-ghan li jkun evitat ir-riskju ta' splużjoni potenzjali, kwalunkwe gassijiet ta' dekompożizzjoni m'ghandhomx jithallew jagħmlu kuntatt ma' l-elementi elettrici tat-tishin.

▼B1.6.1.2. *Kubu b'xibka tal-wajer irqiq*

Biċċa xibka tal-wajer irqiqa ta' l-azzar li ma jissaddadx b'fethiet ta' 0,045 mm għandha tinqata' skond id-disinn f'figura 1. Ix-xibka għandha tintewa u tintrabat b'wajer f'forma ta' kubu bil-parti ta' fuq miftuħa.

1.6.1.3. *Termokoppji*

Termokoppji adattati.

1.6.1.4. *Rekorder*

Kwalunkwe rekorder b'żewġ kanali kkalibrati minn 0 sa 600 °C jew vultaġġ korrispondenti.

1.6.2. **Kondizzjonijiet tat-test**

Is-sustanzi jiġu ttestjati kif riċevuti.

1.6.3. **L-eżekuzzjoni tat-test**

Il-kubu jimtela bis-sustanza għat-test u jittaptap bil-mod, u tiżdied aktar sustanza sakemm il-kubu jkun mimli kompletament. Il-kubu mbagħad jiġi sospiz fiċ-ċentru tal-forn f'temperatura ambjentali. Termokoppja titpoġġa fiċ-ċentru tal-kubu u oħra bejn il-kubu u l-ġenb tal-forn biex tirreġistra t-temperatura tal-forn.

It-temperaturi tal-forn u tal-kampjun jiġu rreġistrati kontinwament waqt li t-temperatura tal-forn tiġi miżjuda għal 400 °C, jew għat-temperatura tat-tidwib jekk din tkun iżgħar, bir-rata ta' 0,5 °C/min.

Meta s-sustanza tqabba it-termokoppja kampjun turi zieda qawwija fit-temperatura oghla mit-temperatura tal-forn.

2. **DATA**

It-temperatura tal-forn li fiha t-temperatura kampjun tilhaq 1-400 °C b'awto-tishin hija rilevanti għal valutazzjoni (ara figura 2).

3. **RAPPURTAR**

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

— deskrizzjoni tas-sustanza għat-test,

— ir-riżultati tal-kejl inkluża l-kurva tat-temperatura/hin,

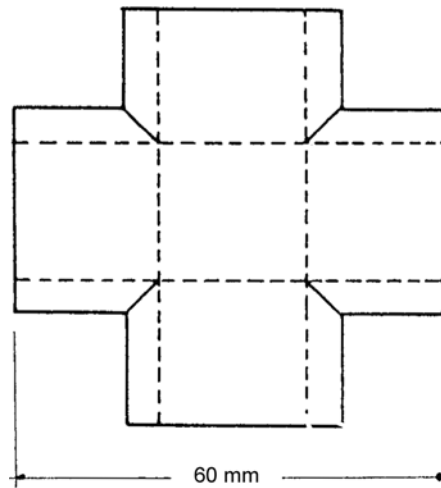
— ir-rimarki addizzjonali kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

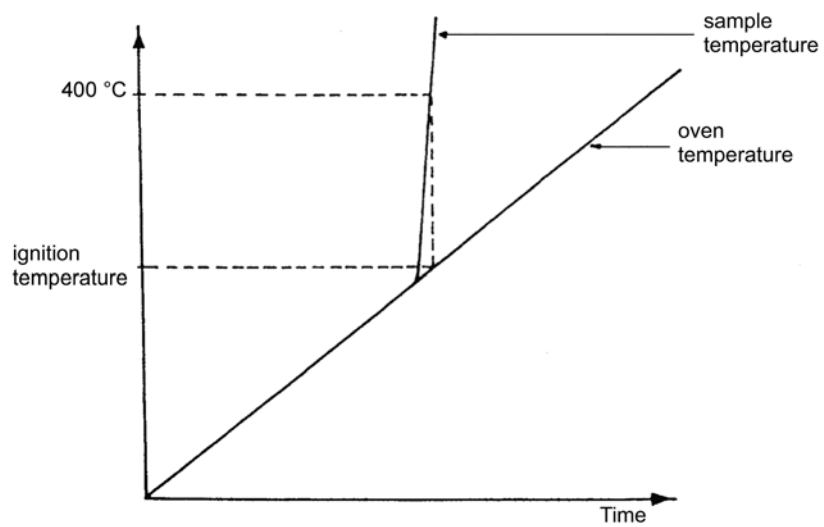
NF T 20-036 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼ B*Figura 1*

Disinn ta' kubu tat-test ta' 20 mm

*Figura 2*

Kurva tipika tat-temperatura/hin



▼B**A.17. PROPRJETAJIET OSSIDANTI (SOLIDI)****1. METODU****1.1. DAHLA**

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

Dan it-test mhuwiex applikabbli għal likwidi, gassijiet, sustanza fjamabbli jew esplożivi hafna, jew perrossidi organiċi.

Dan it-test jista' ma jsirx meta eżami tal-formula strutturali jistabbilixxi minghajr ebda dubju raġjonevoli li s-sustanza mhijiex kapaċi li tirreaġixxi eżotermikament ma' materjal kombustibbli.

Bil-għan li jkun żgurat jekk it-test għandux jitwettag bi prekawzjonijiet speċjali, għandu jitwettag test preliminari.

1.2. TIFSIRIET U UNITAJIET

Hin tal-kombustjoni: żmien ta' reazzjoni, f'sekondi, meħud għaż-żona ta' reazzjoni biex timxi mal-gożż, wara l-proċedura mfissra f'1.6.

Rata ta' kombustjoni: espressa f'millimetri għal kull sekonda.

Rata massima ta' kombustjoni: l-ogħla valur ta' rata ta' kombustjoni miksuba b'tahlitiet li jinkludu minn 10 sa 90 % bil-piż ta' ossidant.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Nitrat tal-barju (grad analitiku) huwa użat bħala sustanza ta' referenza għat-test u t-test preliminari.

It-tahlita ta' referenza hija dik it-tahlita ta' nitrat tal-barju b'ċelluloża f'forma ta' trab, ippreparat skond 1.6, li għandu rata ta' kombustjoni massima (is-soltu tahlita b'60 % nitrat tal-barju bil-piż).

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU

Test preliminari jitwettag fl-interess tas-sikurezza. Ma jkunx mehtieg aktar ittestjar meta t-test preliminari jindika b'mod ċar li s-sustanza għat-test għandha proprjetajiet ossidanti. Meta dan mhuwiex il-każ, is-sustanza mbagħad għandha tkun soġġetta għat-test shih.

Fit-test shih, is-sustanza għat-test u sustanza kombustibbli definita tiġi mhallta fi proporzjonijiet diversi. Kull tahlita mbagħad tiġi ffurmata f'gożż u l-gożż jitqabbad f'tarf minnu. Ir-rata ta' kombustjoni massima ddeterminata titqabbal mar-rata ta' kombustjoni massima tat-tahlita ta' referenza.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Jekk ikun mehtieg, kwalunkwe metodu ta' thin u tahlit huwa validu bil-kondizzjoni li d-differenza fir-rata ta' kombustjoni massima fis-sitt testijiet separati tarja mill-valur medju aritmetiku b'mhux aktar minn 10 %.

▼B**1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU****1.6.1. Preparazzjoni****1.6.1.1. *Is-sustanza għat-test***

Naqqas il-kampjun għat-test għal daqs ta' partikula $< 0,125$ mm bl-użu tal-proċedura li ġejja: għarbel is-sustanza għat-test, ithan il-frazzjoni li jkun baqa', irrepeti l-proċedura sakemm il-porzjon kollha għat-test tkun għaddiet mill-għarbiel.

Jista' jintuza kwalunkwe metodu ta' thin jew ta' tgharbil li jissodisfa l-kriterji ta' kwalità.

Qabel tithejja t-tahlita s-sustanza titnixxef f' 105°C , sakemm jinkiseb il-piz kostanti. Jekk it-temperatura ta' dekompożizzjoni tas-sustanza għat-test hija taht il- 105°C , is-sustanza għandha titnixxef b'temperatura adattata iktar baxxa.

1.6.1.2. *Sustanza kombustibbli*

Ċelluloża f'forma ta' trab hija użata bħala sustanza kombustibbli. Iċ-ċelluloża għandha tkun tat-tip użata għal kromatografija ta' saff irqiq jew għal kromatografija tal-kolonna. Wahda tat-tip b'fibri ta' tul ta' aktar minn 85 % bejn 0,020 u 0,075 mm instabu li kienu adattati. It-trab taċ-ċelluloża jiġi mgħoddi minn għarbiel b'toqob ta' daqs ta' 0,125 mm. L-istess lott ta' ċelluloża għandu jintuza matul it-test.

Qabel tithejja t-tahlita, iċ-ċelluloża f'forma ta' trab titnixxef f' 105°C , sakemm jinkiseb piz kostanti.

Jekk tintuza ċ-ċana ta' l-injam fit-test preliminari, allura pprepara ċ-ċana ta' l-injam artab billi tiġbor il-porzjon li tghaddi minn għarbiel b'toqob ta' 1,6 mm, hallat sewwa, imbagħad nixxef f' 105°C għal erba' sigħat f'saff ta' mhux oħxon aktar minn 25 mm. Kessah u aħžen f'kontenitur li fih ma jidholx arja mimli kemm sa kemm huwa prattiku u sakemm ikun meħtieġ, preferibbilment fi żmien 24 siegħa mit-tnixxif.

1.6.1.3. *Għajn ta' fjamabilità*

Fjamma taħraq minn berner tal-gass (dijametru minimu ta' 5 mm) għandha tintuza bħala l-għajn ta' fjamabilità. Jekk tintuza għajn ta' fjamabbiltà oħra (eż. meta jsir it-test f'atmosfera inerta), id-deskrizzjoni u l-gustifikazzjoni għandhom ikunu rrapurtati.

1.6.2. L-eżekuzzjoni tat-test

Nota:

Tahlitiet ta' ossidaturi ma' ċelluloża jew ċana ta' l-injam iridu jkunu ttrattati bħala potenzjalment splussivi u mmaniġġjati b'attenzjoni xierqa.

1.6.2.1. *Test preliminari*

Is-sustanza mnixxa hija mħallta sewwa ma' ċelluloża mnixxa jew ċana ta' l-injam fil-proporzjonijiet ta' 2 ta' sustanza għat-test għal 1 ta' ċelluloża jew ċana ta' l-injam bil-piz u t-tahlita tiġi ffurmata f'gozz żgħir forma ta' kon ta' dimensjonijiet 3,5 cm (dijametru tal-baži) x 2,5 cm (għoli) pemezz tal-mili, mingħajr rass, ta' oġġett li jiffirma kon (eż. lembut tal-ħġieġ tal-laboratorju biż-żennuna magħluqa).

▼B

Il-gozz jitpoġġa fuq pjanċa tal-bażi li mhijiex kombustibbli, mhux poruża u b'konduktività baxxa ta' shana. It-test għandu jitwettagħ f'armarju tad-duhhan bhal f'1.6.2.2.

L-ghajn tal-fjammabbiltà jitressaq f'kontatt mal-kon. Is-sahha u d-dewmien tar-reazzjoni riżultanti għandhom ikunu osservati u rreġistrati.

Is-sustanza għandha tkun ikkunsidrata bhala ossidanti jekk ir-reazzjoni hija qawwija.

Fi kwalunkwe każ fejn ir-riżultat huwa dubjuż, imbagħad ikun neċessarju li jsir it-test kollu mfisser hawn taht.

1.6.2.2. *It-test tas-serje*

Ipprepara tahlitiet ta' ossidatur ċelluloża li jkun fihom minn 10 sa 90 % piż ta' ossidatur f'żidiet ta' 10 %. F'każijiet li kważi qegħdin fl-istess limiti, tahlitiet ta' ossidatur ċelluloża intermedji għandhom jintużaw biex tinkiseb ir-rata ta' fjammabbiltà massima b'aktar preċiżjoni.

Il-gozz ikun iffurmat permezz ta' forma. Din il-forma magħmula mill-metall, għandha tul ta' 250 mm b'taqsimha trasversali trijangulari ta' għoli intern ta' 10 mm u wisa' interna ta' 20 mm. Żewġ pjanċi tal-metall jiġu mmuntati fuq iż-żewġ naħat tal-forma f'direzzjoni longitudinali bhala limitazzjonijiet laterali li johorġu 2 mm "il barra mit-tarf l-għoli tat-taqsimha trasversali trijangulari (figura). Dan l-arranġament jimtela liberament bi ftit tahlita żejda. Wara li l-forma tintefa" għal darba waħda minn għoli ta' 2 cm fuq superfiċje solida, is-sustanza żejda li tibqa' titneħħa b'karta milwija. Il-limitazzjonijiet laterali jitneħħew u t-trab li jibqa' jihi ċattjat, permezz ta' romblu. Pjanċa ta' bażi mhux kombustibbli, mhux poruża u b'konduktività ta' shana baxxa mbagħad titpoġġa fuq il-forma, l-apparat jinqaleb u l-forma titneħħa.

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

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

Minhabba l-igroskopiċità taċ-ċelluloża u ta' whud mis-sustanzi għat-test, it-test għandu jitwettagħ malajr kemm jista' jkun.

Qabbad ġenb wiehed tal-gozz billi tressqu mal-fjamma.

Kejjel il-hin tar-reazzjoni fuq distanza ta' 200 mm wara li z-zona ta' reazzjoni tinfirex sa distanza inizjali ta' 30 mm.

It-test jitwettagħ bis-sustanza ta' referenza u ta' l-inqas darba b'kull waħda mill-firxa ta' tahlitiet tas-sustanza għat-test maċ-ċelluloża.

Jekk ir-rata ta' fjammabbiltà massima tinsab li hija akbar b'mod sinifikanti minn dik tat-tahlita ta' referenza, it-test jista' jitwaqqaf; inkella t-test għandu jkun ripetut għal hames darbiet għal kull waħda mit-tliet tahlitiet li jagħtu l-aktar rata veloci ta' fjammabbiltà.

▼B

Jekk hemm suspett li r-riżultat huwa pozittiv falz, allura t-test għandu jkun ripetut bl-użu ta' sustanza inerta bl-istess daqs ta' partikula, bhall-*kieselguhr*, flok iċ-ċelluloża. Alternattivament, it-tahlita tas-sustanza għat-test maċ-ċelluloża, li għandha l-aktar rata veloċi ta' fjamabilità, għandha tkun ittestjata mill-ġdid f'atmosfera inerta ($< 2\%$ v/v kontenut ta' ossiġnu).

2. DATA

Għal raġunijiet ta' sikurezza r-rata ta' fjamabilità massima – mhux il-valur medju – għandha tkun ikkunsidrata bħala l-proprjetà ossidanti karatteristika tas-sustanza għat-test.

L-ogħla valur tar-rata tal-fjamabilità f'serje ta' sitt testijiet ta' tahlita definita huwa rilevanti għall-valutazzjoni.

Piġi graff ta' l-ogħla valur tar-rata tal-fjamabilità għal kull tahlita kontra l-koncentrazzjoni ta' l-ossidatur. Mill-graff hu r-rata tal-fjamabilità massima.

Is-sitt valuri mkejla tar-rata tal-fjamabilità f'serje miksuba mit-tahlita mar-rata ta' fjamabilità massima ma tridx tiddifferenzja mill-valur medju aritmetiku b'aktar minn 10 %; inkella l-metodi tat-tin u t-tahlit jridu jittejbju.

Qabbel ir-rata ta' fjamabilità massima miksuba mar-rata ta' fjamabilità massima tat-tahlita ta' referenza (ara 1.3).

Jekk it-testijiet jitwettqu f'atmosfera inerta, ir-rata ta' reazzjoni massima titqabbel ma' dik tat-tahlita ta' referenza f'atmosfera inerta.

3. RAPPORTAR

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

- l-identità, il-kompożizzjoni, il-purità, il-kontenut ta' umdità eċċ. tas-sustanza ttestjata;
- kwalunkwe trattament tal-kampjun għat-test (eż. thin, tnixxif);
- l-għajn tal-fjamabbiltà uzata fit-testijiet;
- ir-riżultati tal-kejl;
- il-mod ta' reazzjoni (eż. fjamabilità lelliexa fuq is-superfiċje, fjamabilità tul il-massa kollha, kwalunkwe informazzjoni li tirrwarda l-prodotti ta' kombustjoni, ...);
- ir-rimarki rilevanti kollha għall-interpretazzjoni tar-riżultati, inkluza deskrizzjoni ta' l-enerġija fizika (fjamma, spark, duħhan, hruq bil-mod sakemm isir faħam, eċċ.) u t-tul ta' żmien approssimattiv prodott fit-test preliminari tas-sikurezza/skrinjar kemm għas-sustanza għat-test kif ukoll għal dik ta' referenza;
- ir-riżultati minn testijiet b'sustanza inerta, jekk hemm;
- ir-riżultati minn testijiet f'atmosfera inerta, jekk hemm.

▼B

3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Sustanza titqies li hija sustanza ossidanti meta:

- (a) fit-test preliminari, hemm reazzjoni vigoruża;
- (b) fit-test shih, ir-rata ta' f'jammabilità massima tat-tahlitiet ittestjati hija oghla minn jew ugwali għar-rata ta' f'jammabilità massima tat-tahlita ta' referenza taċ-ċelluloża u n-nitrat tal-barju.

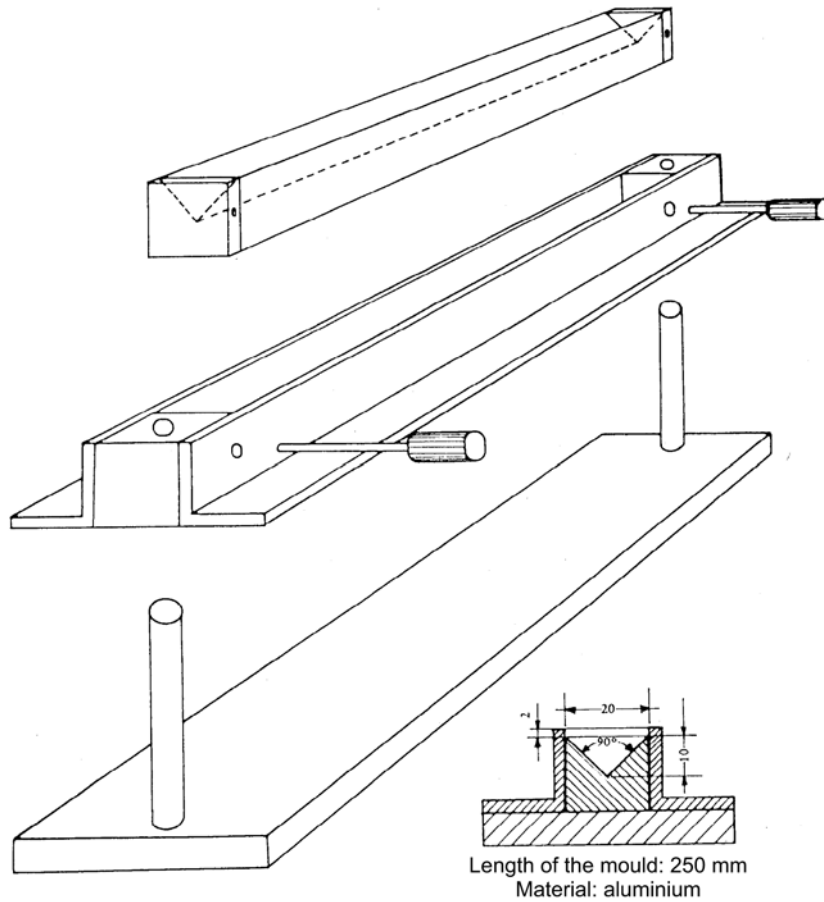
Bil-għan li jkun evitat pozittiv falz, ir-riżultati miksuba meta s-sustanza għat-test tiġi hallat ma' materjal inert u/jew meta jsir l-ittestjar taht atmosfera inerta, għandhom jiġu kkunsidrati wkoll fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

▼B*Appendiċi**Figura***Forma u aċċessorji għall-preparazzjoni tal-gożż**

(Id-dimensjonijiet kollha f'millimetri)



▼B**A.18. IL-MEDJA TAL-PIŻ MOLEKULARI TAN-NUMRU U D-DISTRIBUZZJONI TAL-PIŻ MOLEKULARI TAL-POLIMERI****1. METODU**

Dan il-metodu Kromotografiku bil-Permeazzjoni tal-Gel huwa replika tal-OECD TG 118 (1996). Il-prinċipji fundamentali u aktar informazzjoni teknika jinsabu fir-referenza 1.

1.1. DAHLA

Ladarba l-proprietajiet tal-polimeri huma daqshekk differenti, huwa impossibbli li jiġi deskritt metodu wiehed li jaghti l-kondizzjonijiet preċiżi għas-separazzjoni u l-valutazzjoni li japplikaw għal kull sitwazzjoni u għal kull haġa li tiġri waqt is-separazzjoni tal-polimeri. Partikolarment u ta' spiss, sistemi ta' polimeri komplessi mhumieq soġġetti għall-kromatografija bil-permeazzjoni tal-gel (GPC). Meta l-GPC mhuwiex prattikabbli, l-piż molekulari jista' jiġi deċiż b'metodi oħrajn (ara l-Anness). F'dawn il-każijiet, għandhom jinghataw id-dettalji u l-ġustifikazzjonijiet kollha għall-metodu użat.

Il-metodu deskritt huwa bbażat fuq l-istandard DIN 55671 (1). F'dan l-istandard DIN tinsab informazzjoni dettaljata fuq kif għandhom jitmexxew dawn l-esperimenti u kif għandha tiġi vvalutata d-DATA. F'każ illi hemm bżonn li l-kondizzjonijiet ta' l-esperiment jinbidlu, dawn il-bidliet iridu jiġu ġustifikati. Jistgħu jintużaw standards oħrajn jekk ikun hemm ir-referenzi kollha. Il-metodu deskritt juża kampjuni tal-polisterin ta' politixrid magħruf għall-kalibrazzjoni, u jista' jagħti l-każ li jrid jiġi modifikat biex jaqbel ma' ċerti polimeri, eż. polimeri li jinhallu fl-ilma u polimeri *long-chain branched*.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Il-medja tal-piż molekulari tan-numru M_n u l-medja tal-piż molekulari tal-piż M_w huma ddeterminati skond l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

fejn,

H_i huwa l-livell tas-sinjal ta' osservazzjoni mil-linja ta' bażi għall-volum ta' retenzjoni V_i ,

M_i huwa l-piż molekulari tal-frazzjoni tal-polimeri fil-volum ta' retenzjoni V_i , u

n huwa n-numru tal-punti ta' DATA.

Il-wisa' tad-distribuzzjoni tal-piż molekulari, li hija mizura tat-tixrid tas-sistema, tinghata bil-proporzjon M_w/M_n .

▼B

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Ladarba l-GPC huwa metodu relattiv, hemm bżonn ta' kalibrazzjoni. Normalment jintużaw standards tal-polistiren b'distribuzzjoni limitata u mibnija linearment u li għandhom piż molekulari medju M_n u M_w u distribuzzjoni ta' piż molekulari magħrufa. Il-kurva tal-kalibrazzjoni tista' tintuża biss fid-determinazzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun mhux magħruf jekk il-kondizzjonijiet għas-separazzjoni tal-kampjun u l-standards intgħażlu b'mod preċiżament l-istess.

Ir-relazzjoni ddeterminata bejn il-piż molekulari u l-volum ta' elużjoni huwa validu biss taht il-kondizzjonijiet speċifiċi ta' l-esperiment partikolari. Il-kondizzjonijiet fuq kolloxx jinkludu t-temperatura, s-solvent (jew tahlita tas-solventi), il-kondizzjonijiet tal-kromatografija u l-kolonna tas-separazzjoni jew is-sistemi tal-kolonni.

Il-piż molekulari tal-kampjuni ddeterminati b'dan il-mod huma valuri relattivi u huma deskritti bħala “piżijiet molekulari ekwivalenti għall-polistiren”. Dan ifisser illi skond id-differenzi strutturali u kimiċi bejn il-kampjun u l-standards, il-piżijiet molekulari jistgħu jiddevjaw mill-valuri assoluti sa grad iktar jew inqas. Jekk jintużaw standards oħrajn, eż. il-glikol tal-polietilin, l-ossidu tal-politin, il-metakrilat tal-polimetil, aċidu poliakriliku, għandha titniżżel ir-raġuni.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-EŻAMI

Kemm id-distribuzzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun kif ukoll il-piżijiet molekulari medji (M_n , M_w) jistgħu jiġu ddeterminati billi jintuża l-GPC. Il-GPC huwa metodu speċjali ta' kromatografija likwida fejn il-kampjun jiġi separat skond il-valuri idrodinamiċi tal-kostitwenti individwali (2).

Is-separazzjoni ssir kif il-kampjun jgħaddi minn ġo kolonna mimlija b'materjal poruż, tipikament ġel organiku. Molekoli żgħar jistgħu jippenetraw il-pori filwaqt li l-molekoli kbar ma jistgħux. Il-passaġġ tal-molekoli kbar huwa, għalhekk, iqsar u għalhekk huma jippenetraw l-ewwel. Il-molekoli ta'daqs medju jippenetraw minn uħud mill-pori u jgħaddu iktar tard. L-iżgħar molekoli, b'raġġ idrodinamiku medju iżgħar mill-pori tal-ġel jistgħu jippenetraw il-pori kollha. Dawn ikun elużi l-aħħar.

Idealment, is-separazzjoni hija ddeterminata biss skond id-daqs ta' l-ispeċi tal-molekoli, imma fil-prattika huwa diffiċli li wiehed jevita xi interferenza mill-assorbiment L-ippakkjar mhux ugwali tal-kolonni u volumi mejtin jistgħu jaggravaw is-sitwazzjoni (2).

L-osservazzjoni hija effettwata minn, eż. l-indiċi refrattiv jew l-assorbiment tal-UV u tagħti kurva tad-distribuzzjoni sempliċi. Madankollu, biex il-kurva tingħata valuri attwali tal-piż molekulari, huwa neċessarju li l-kolonna tiġi kkalibrata billi polimeri ta' piż molekulari magħruf u, idealment, ta' struttura simili hafna, jitniżżlu 'l isfel, eż. standards tal-polistiren varji. B'mod tipiku, għandha tirriżulta kurva Gaussian, xi drabi mgħawwġa minhabba denb fuq in-naha baxxa tal-piż molekulari, fejn il-fus vertikali jindika l-kwantità, skond il-piż, ta' l-ispeċi tal-piż molekulari varji, u l-fus orizzontali l-piż molekulari rreġistrat.

▼B**1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ**

Ir-ripetibilità (Devjazzjoni ta' Livell Stabbilit: RSD) tal-volum ta' l-eluzzjoni għandha tkun ahjar minn 0,3 %. Ir-ripetibilità mixtieqa ta' l-analiżi għandha tiġi żgurata permezz ta' korrezzjoni skond standard intern jekk kromatogram huwa evalwat b'mod li huwa dipendenti fuq il-hin u ma jaqbilx mal-kriterju msemmi hawn fuq (1). Il-poli-tixrid jiddependi fuq il-piżijiet molekulari ta' l-istandards. Fil-każ ta' standards tal-polistirene, valuri tipici huma:

$$M_p < 2\,000 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p huwa l-piż molekulari ta' l-istandard fil-quċċata tal-massimu)

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' L-EŻAMI**1.6.1. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet standard tal-polistiren**

L-istandards tal-polistiren għandhom jinhallu billi jithalltu b'attenzjoni fl-eluwent magħżul. Ir-rakkomandazzjonijiet tal-fabbrikant għandhom jiġu kkunsidrati waqt il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet.

Il-konċentrazzjonijiet ta' l-istandards magħżula jiddependu fuq diversi fatturi: eż. il-volum ta' l-injezzjoni, il-viskożità tas-soluzzjoni u s-sensittività tad-ditektek analitiku. Il-volum massimu ta' l-injezzjoni għandu jiġi adattat għat-tul tal-kolonna biex tiġi evitata tagħbija żejda. Volumi ta' injezzjoni tipici għas-separazzjonijiet analitiċi bl-użu tal-GPC b'kolonna ta' 30 cm × 7,8 mm huma normalment bejn 40 u 100 µl. Volumi oghla huma possibbli, imma m'għandhomx jaqbu 250 µl. L-ahjar proporzjon ta' bejn il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni għandha tiġi ddeterminata qabel ma tiġi kkalibrata l-kolonna.

1.6.2. Preparazzjoni tal-kampjun tas-soluzzjoni

Fil-prinċipju, l-istess htigijiet japplikaw għall-preparazzjoni tal-kampjuni tas-soluzzjonijiet. Il-kampjun għandu jinhall f'solvent xieraq, eż. it-tetraidrofuran (THF), billi jithawwad bil-galbu. Taht l-ebda ċirkostanza m'għandu jinhall permezz ta' banju ultrasoniku. Fejn huwa neċessarju, il-kampjun tas-soluzzjoni għandu jiġi ppurifikat permezz ta' filtru tal-membrana b'pori ta' daqs bejn 0,2 u 2 µm.

Il-preżenza ta' partikoli li ma nhallux għanda titnizzel fir-rapport finali għar-raġuni li dawn jistghu jirriżultaw minn speċi ta' piż molekulari għoli. Għandu jintuza metodu xieraq biex jiġi ddeterminat il-perċentaġġ skond il-piż tal-partikoli li nhallu. Is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw fi-żmien 24 siegħa.

1.6.3. L-apparat

— ġibjuni tas-solventi:

— *degasser* (fejn xieraq),

— pompa

▼B

— apparat biex inaqas l-impuls (fejn hemm bżonn)

— sistema ta' injezzjoni,

— kolonni tal-kromatografija,

— ditekter

— *flowmeter* (fejn hemm bżonn),

— proċessur li jirrekordja d-DATA,

— kontenitur għall-iskart

Għandu jiġi żgurat li s-sistema GPC hija inerta fir-rigward tas-solventi użati (eż. bl-użu ta' kapillari ta' l-azzar għas-solvent THF).

1.6.4. **L-injezzjoni u s-sistema li twassal s-solventi**

Volum definit tal-kampjun tas-soluzzjoni jitgħabba fuq il-kolonna bl-użu ta' *auto-sampler* jew manwalment f'żona definita preċiżament. L-irtirar jew l-għafis tal-*plunger* tas-siringa b'mod mgħaġġel, jekk isir manwalment, jista' jikkawża bidliet fid-distribuzzjoni tal-piż molekulari osservata. Is-sistema tat-twassil tas-solvent għandha, safejn huwa possibbli, tkun hielsa mill-impulsi u idealment għandha tinkludi apparat li jnaqqas l-impulsi. Il-*flowrate* tkun madwar 1 ml/min.

1.6.5. **Il-kolonna**

Skond il-kampjun, il-polimer ikun karatterizzat mill-użu ta' kolonna sempliċi jew minn numru ta' kolonni konnessi f'sekwenza. Ghadd ta' materjali porużi tal-kolonni bi proprjetajiet definiti (eż. daqs tal-pori, limiti ta' esklużjoni) huma disponibbli kummerċjalment. L-għażla tal-ġel ta' separazzjoni jew tat-tul tal-kolonna jiddependi fuq il-proprjetajiet tal-kampjun (volumi idrodinamiċi, distribuzzjoni tal-piż molekulari) u l-kondizzjonijiet speċifiċi għas-separazzjoni bħas-solventi, t-temperatura u l-*flowrate* (1) (2) (3).

1.6.6. **Il-pjanċi teoretiċi**

Il-kolonna jew il-kombinazzjoni tal-kolonni użati għas-separazzjoni għandhom jiġu karatterizzati skond in-numru ta' pjanċi teoretiċi. Dan jinvolvi, f'każ meta t-THF huwa s-solvent eluwent, it-tagħbija ta' soluzzjoni ta' etile benzin jew ta' sustanza mahlula mhux b'polarità xierqa fuq kolonna ta' tul magħruf. In-numru ta' pjanċi teoretiċi huwa mogħti skond l-ekwazzjoni li ġejja:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{or} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

fejn,

N = in-numru tal-pjanċi teoretiċi

V_e = il-volum ta' elużjoni fil-quċcata tal-massimu

▼ B

W = il-quċċata tal-wisa' tal-linja bażi

$W_{1/2}$ = il-quċċata tal-wisa' fin-nofs ta' l-gholi

1.6.7. **L-effiċjenza tas-separazzjoni**

Flimkien ma' l-ammont tal-pjanċi teoretiċi, li hija kwantità li tistabbilixxi il-*bandwidth*, l-effiċjenza tas-separazzjoni għandha sehem ukoll, u din hija stabbilita skond kemm hi wieqfa l-kurva tal-kalibrazzjoni. L-effiċjenza tas-separazzjoni ta' kolonna tinkisebskond ir-relazzjoni li ġejja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

fejn,

V_{e, M_x} = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari M_x

$V_{e,(10.M_x)}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari ta' għaxar darbiet iktar

Ir-riżoluzzjoni tas-sistema hija normalment definita kif ġej:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

fejn,

V_{e1}, V_{e2} = il-volumi ta' elużjoni taż-żewġ standards tal-polistiren fil-quċċata tal-massimu

W_1, W_2 = il-quċċata tal-wisat tal-linji ta' bażi

M_1, M_2 = il-piżijiet molekulari fil-quċċata tal-massimu (għandu jkun hemm differenza b' fattur ta' 10)

Il-valur R għas-sistema tal-kolonni għandu jkun ikbar minn 1.7 (4).

1.6.8. **Solventi**

Is-solventi kollha għandhom ikollhom purità għolja (għat-THF tintuża purità ta' 99,5 %). Id-depożitu tas-solventi (f'atmosfera ta' gass inert, jekk huwa neċessarju) għandu jkun kbir biżżejjed għall-kalibrazzjoni tal-kolonna u għal diversi analiżijiet tal-kampjuni. Il-gass għandu jitneħħa mis-solvent qabel ma jgħaddi għall-kolonna minn go pompa.

1.6.9. **Kontroll tat-temperatura**

It-temperatura tal-komponenti kruċjali interni (iċ-ċirku ta' injezzjoni (*injection loop*), il-kolonni, id-ditekter, u t-tubi) għandha tkun kostanti u konsistenti skond l-għażla tas-solvent.

▼B**1.6.10. Ditekter**

Il-funzjoni tad-ditekter hija li jirreġistra b'mod kwantitattiv il-konċentrazzjoni tal-kampjun li ġie elwat mill-kolonna. Biex jiġi evitat li l-quċċati jitwessgħu, il-volum tal-*cuvette* taċ-ċellula tad-ditekter għandu jinżamm żgħir kemm jista' jkun. M'għandux ikun akbar minn 10 μ l hlief għal ditekters li jxerrdu d-dawl u għal ditekters tal-viskożità. Normalment tintuża rifrattometrija differenzjali għall-osservazzjoni. Madankollu, jekk mehtieġ mill-proprjetajiet speċifiċi tal-kampjun jew tas-solvent ta' elużjoni, jistgħu jintużaw ditekters ohrajn, eż. UV/VIS, IR, ditekters tal-viskożità, eċċ.

2. DATA U RAPPORTAR**2.1. DATA**

L-istandard DIN (1) għandu jiġi kkonsultat għall-kriterji ta' valutazzjoni dettaljata kif ukoll għall-kondizzjonijiet għall-ġbir u għall-proċessar ta' DATA.

Għal kull kampjun għandhom isiru żewġ esperimenti indipendenti. Għandhom jiġu analizzati individwalment.

M_n , M_w , M_w/M_n u M_p għandhom jiġu pprovduti għal kull kejl. Huwa neċessarju li jiġi espliċitament indikat li l-valuri mkejla huma valuri relattivi ekwivalenti għall-piżijiet molekulari ta' l-istandard użat.

Wara li jiġu ddeterminati il-volumi ta' ritenzjoni jew il-hinijiet ta' ritenzjoni (possibbilment irrangati permezz ta' standard intern), valuri log M_p (fejn M_p huwa l-massimu tal-quċċata ta' l-istandard tal-kalibrazzjoni) għandhom jitnizzlu ma' wiehed minn dawk il-kwantitajiet. Mill-inqas żewġ punti ta' kalibrazzjoni huma neċessarji għal kull sett ta' għaxar piżijiet molekulari, u mill-inqas hames punti ta' kejl huma mehtieġa għall-kurva totali, u dan għandu jkopri l-piż molekulari smat tal-kampjun. It-tarf' baxx tal-kurva tal-kalibrazzjoni tal-piż molekulari huwa definit permezz ta' benzin *n-hexyl* jew sustanza mahlula mhux polari ohra. xierqa l-medja tan-numru u l-medja tal-piż molekulari huma ġeneralment iddeterminati permezz ta' proċessar tad-DATA elettronika bbażata fuq il-formuli tas-sezzjoni 1.2. F'każ li tintuża d-diġitalizzazzjoni manwali, ASTM D 3536-91 jista' jiġi kkonsultat (3).

Il-kurva tad-distribuzzjoni għandha tiġi pprovduta f'forma ta' tabella jew figura (frekwenza differenzjali jew persentaġġi tas-somom ma' log M). Fir-rappreżentazzjoni grafika, sett wiehed ta' għaxar piżijiet molekulari huwa normalment wiesa' 4 cm u l-massimu tal-quċċata għandu jkun twil xi 8 cm. F'każ ta' kurvi tad-distribuzzjoni integrali, d-differenza fil-koordinat bejn 0 u 100 % għandha tkun ta' xi 10 cm.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

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

2.2.1. Sustanza tat-test

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test (identità, addittivi, impuritajiet),

▼B

- deskrizzjoni tat-trattament tal-kampjun, osservazzjonijiet, problemi.

2.2.2. Strumentazzjoni

- kontenitur ta' l-eluwent, gass inert, tneħħija ta' gass żejjed ta' l-eluwent, kompożizzjoni ta' l-eluwent, impuritajiet,
- pompa, apparat li jnaqqas il-polz, sistema ta' injezzjoni,
- kolonni tas-separazzjoni (il-fabbrikant, l-informazzjoni kollha dwar il-karatteristiċi tal-kolonni bħad-daqs tal-pori, it-tip ta' materjal ta' separazzjoni eċċ., in-numru, it-tul u l-ordni tal-kolonni użati),
- numru ta' pjanċi teoretiċi tal-kolonni (jew kombinazzjoni), effiċjenza tas-separazzjoni (riżoluzzjoni tas-sistema).
- informazzjoni dwar is-simetrija tal-quċċati,
- temperatura tal-kolonni, tip ta' kontroll tat-temperatura,
- indikatur (prinċipju tal-kejl, tip, *cuvette*, volum),
- *flowmeter* jekk użat (il-fabbrikant, il-prinċipju tal-kejl),
- sistema għar-reġistrazzjoni u proċessar tad-DATA (*hardware* u *software*)

2.2.3. Kalibrazzjoni tas-sistema

- deskrizzjoni dettaljata tal-metodu użat biex tinbena l-kurva tal-kalibrazzjoni,
- informazzjoni dwar il-kriterji ta' kwalità ta' dan il-metodu (eż. koeffiċjent tal-korrelazzjoni, *error sum of squares* eċċ.),
- informazzjoni dwar l-estrapolazzjonijiet, l-assunzjonijiet u l-approssimazzjonijiet li saru waqt il-proċedura esperimentali u l-valutazzjoni u l-proċessar tad-DATA,
- il-kejl kollu użat għall-konstruzzjoni tal-kurva ta' kalibrazzjoni għandu jiġi dokumentat f'tabella li tinkludi l-informazzjoni li ġejja għal kull punt ta' kalibrazzjoni:
 - l-isem tal-kampjun,
 - il-fabbrikant tal-kampjun,
 - il-valuri karatteristiċi ta' l-istandards M_p , M_n , M_w u M_w/M_n , kif ipprovduti mill-fabbrikant jew kif miġjuba minn kejl sussegwenti, flimkien ma' dettalji dwar il-metodu ta' determinazzjoni,
 - il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni,

▼B

- il-valur M_p użat għall-kalibrazzjoni,
- il-valur ta' l-elużjoni jew il-hin taż-żamma kkoreġut imkejjejl fl-ogħla punt massimu,
- $l-M_p$ kkalkulat fl-ogħla punt massimu,
- il-persentaġġ ta' żball ta' $l-M_p$ kkalkulat u l-valur tal-kalibrazzjoni.

2.2.4. Valutazzjoni:

- valutazzjoni fuq bażi ta' hin: il-metodi użati biex tkun żgurata r-riproduzzjoni mehtieġa (metodu ta' korrezzjoni, standard intern, eċċ.),
- informazzjoni dwar jekk l-istima gietx affettwata fuq il-bażi tal-volum ta' l-elużjoni jew il-hin taż-żamma,
- informazzjoni dwar il-limiti tal-valutazzjoni jekk quċcata mhijiex analizzata kompletament,
- deskrizzjoni ta' metodi li jneħħu x-xkiel, jekk użati,
- proċeduri ta' preparazzjoni u trattament minn qabel tal-kampjun,
- il-preżenza ta' partikoli mhux mahlulin, jekk hemm,
- il-volum ta' l-injezzjoni (μ l) u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni (mg/ml),
- osservazzjonijiet li jindikaw effetti li jwasslu għal devjazzjonijiet mill-profil GPC ideali,
- deskrizzjoni dettaljata tal-modifikazzjonijiet kollha fil-proċeduri ta' l-ittestjar,
- dettalji ta' l-iskali ta' żbalji,
- kwalunkwe informazzjoni oħra u osservazzjonijiet rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati,

3. REFERENZI

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil I.
- (2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., u Bly, D. D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼ B*Appendiċi***Eżempji ta' metodi oħra għad-determinazzjoni tal-piż numru medju molekulari (M_n) għall-polimeri**

Il-kromatografija bil-permeazzjoni tal-ġel (GPC) hija l-metodu preferut għad-determinazzjoni ta' M_n , speċjalment meta huwa disponibbli sett ta' standards, li l-istruttura tagħhom hija komparabbli ma' l-istruttura tal-polimer. Madankollu, fejn hemm diffikultajiet prattiċi fl-użu tal-GPC jew fejn diġà mistenni li s-sustanza ma tgħaddix mill-kriterju regolatorju M_n (u li jehtieġ konferma), metodi alternattivi oħra huma disponibbli, bħal:

1. Użu ta' Proprjetajiet Kolligativi**1.1 Ebulljoskopija/Krijoskopija**

tinvolvi l-kejl ta' l-elevazzjoni tat-temperatura tat-tgħolija (ebulljoskopija) jew id-depressjoni tat-temperatura ta' l-iffriżar (krijoskopija) ta' solvent, meta jiżdied il-polimer. Il-metodu huwa bbażat fuq il-fatt li l-effett tal-polimer mahlul fuq it-temperatura tat-tgħolija/ta' l-iffriżar tal-likwidu jiddependi fuq il-piż molekulari tal-polimer (1)(2).

Applikabilità, $M_n < 20\,000$.

1.2 Tbxaxxa tal-Pressjoni tal-Fwar

tinvolvi l-kejl tal-pressjoni tal-fwar minn likwidu ta' referenza magħżul qabel u wara ż-żieda ta' kwantitajiet magħrufa ta' polimer (1)(2).

Applikabilità, $M_n < 20\,000$ (teoretikament; iżda fil-prattika ta' valur limitat).

1.3 L-Ozmometrija tal-Membrana

hija bbażata fuq il-prinċipju ta' l-ożmosi, i.e. it-tendenza naturali ta' molekuli solventi li jgħaddu minn membrana semi-permeabbli minn soluzzjoni dilwita għal soluzzjoni konċentrata biex jinkiseb l-ekwilibriju. Fit-test, is-soluzzjoni dilwita hija f'konċentrazzjoni żero, waqt li s-soluzzjoni konċentrata fiha l-polimer. L-effett tal-ġbid tas-solvent mill-membrana jikkawża differenzjal tal-pressjoni li huwa dipendenti fuq il-konċentrazzjoni u l-piż molekulari tal-polimer (1)(3)(4).

Applikabilità, $M_n < 20\,000 - 200\,000$.

1.4 Ozmometrija tal-Fażi tal-Fwar.

tinvolvi l-paragun tar-rata ta' evaporazzjoni ta' *aerosol* tas-solvent pur ma' mill-anqas tliet *aerosols* li fihom il-polimer f'konċentrazzjonijiet varji (1)(5)(6) Applikabbiltà $M_n < 20\,000$.

Analizi tal-Grupp Terminali $M_n < 20\,000$.

▼B**2. Analizi tal-Grupp Terminali**

Biex jintuża dan il-metodu, huwa mehtieg għarfien kemm ta' l-istruttura komplessiva tal-polimer kif ukoll in-natura tal-gruppi terminali tal-katina (li jridu jkunu distinti mill-iskelettu ewlieni b'eż. NMR jew titrazzjoni/derivatizzazzjoni). Id-determinazzjoni tal-koncentrazzjoni molekulari tal-gruppi terminali preżenti fuq il-polimer tista' twassal għal valur għall-piż molekulari (7) (8) (9).

Applikabbiltà, M_n sa 50 000 (b'affidabilità li tonqos).

3. Referenzi

- (1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.
- (2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
- (3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.
- (5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
- (7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
- (8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
- (9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

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

1. METODU

Dan il-metodu ta' kromatografija bil-permeazzjoni tal-gel hu ripetizzjoni ta' l-OECD TG 119 (1996). Il-prinċipji fundamentali u iktar informazzjoni teknika jinsabu bħala riferenzi.

1.1. DAHLA

Ladarba l-proprietajiet tal-polimeri huma daqshekk varji, huwa impossibbli li jiġi deskritt metodu wiehed li jagħti l-kondizzjonijiet preċiżi għas-separazzjoni u l-valutazzjoni li japplikaw għal kull sitwazzjoni u għal kull haġa li tigri waqt is-separazzjoni tal-polimeri. Ta' spiss u b'mod partikolari, sistemi ta' polimeri kumplessi mhumex soġġetti għall-kromatografija bil-permeazzjoni tal-gel (GPC). Meta il-GPC mhuwiex prattikabbli, il-piż molekulari jista' jiġi deċiż b'metodi oħrajn (ara l-Anness). F'dawn il-kazijiet, għandhom jingħataw id-dettalji u l-gustifikazzjonijiet kollha għall-użu ta' dak il-metodu.

Il-metodu deskritt huwa bbażat fuq l-istandard DIN 55671 (1). F'dan l-istandard DIN tinsab informazzjoni dettaljata fuq kif għandhom jitmexxew dawn l-esperimenti u kif għandha tiġi vvalutata d-DATA. F'każ illi hemm bżonn li l-kondizzjonijiet ta' l-esperiment jinbidlu, dawn il-bidliet iridu jiġu ġġustifikati. Jistgħu jintużaw standards oħrajn jekk ikun hemm ir-referenzi kollha. Il-metodu deskritt juża kampjuni tal-polisterin ta' politixrid magħruf għall-kalibrazzjoni, u jista' jagħti l-każ li jrid jiġi modifikat biex jaqbel ma' ċerti polimeri, eż. polimeri li jinħallu fl-ilma u polimeri *long-chain branched*.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Piż molekulari baxx huwa deskritt arbitrarjament bħala piż molekulari ta' inqas minn 1 000 dalton.

Il-medja tal-piż molekulari tan-numru M_n u l-medja tal-piż molekulari tal-piż M_w huma ddeterminati skond l-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

fejn,

H_i = il-livell tas-sinjal tad-ditektek mil-linji bażi għall-volum ta' retenzjoni V_i ,

M_i = M_i huwa t-toqol molekulari tal-frazzjoni tal-polimeri fil-volum ta' retenzjoni V_i , u n huwa n-numru tal-punti tad-DATA.

Il-wisa' tad-distribuzzjoni tat-toqol molekulari, li hija mizura tat-tixrid tas-sistema, huwa mogħti bil-proporzjon M_w/M_n .

▼B

1.3. SUSTANZI TA' RIFERENZA

Ladarba l-GPC huwa metodu relattiv, hemm bżonn ta' kalibrazzjoni. Normalment jintużaw standards tal-polistiren b'distribuzzjoni limitata u mibnija linearment u li għandhom piż molekulari medju M_n u M_w u distribuzzjoni ta' piż molekulari magħrufa. Il-kurva tal-kalibrazzjoni tista' tintuża biss fid-determinazzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun mhux magħruf jekk il-kondizzjonijiet għas-separazzjoni tal-kampjun u l-standards intgħażlu b'mod preċiżament l-istess.

Ir-relazzjoni ddeterminata bejn il-piż molekulari u l-volum ta' elużjoni huwa validu biss taht il-kondizzjonijiet speċifiċi ta' l-esperiment partikolari. Il-kondizzjonijiet fuq kollox jinkludu t-temperatura, s-solvent (jew tahlita tas-solventi), il-kondizzjonijiet tal-kromatografija u l-kolonna tas-separazzjoni jew is-sistemi tal-kolonni.

Il-piż molekulari tal-kampjuni ddeterminati b'dan il-mod huma valuri relattivi u huma deskritti bħala “piżijiet molekulari ekwivalenti għall-polistiren”. Dan ifisser illi skond id-differenzi strutturali u kimiċi bejn il-kampjun u l-standards, il-piżijiet molekulari jistgħu jiddevjaw mill-valuri assoluti sa grad iktar jew inqas. Jekk jintużaw standards oħrajn, eż. il-glikol tal-polietilin, l-ossidu tal-politin, il-metakrilat tal-polimetil, aċidu poliakriliku, għandha titniżżel ir-raġuni.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TA' L-EŻAMINAZZJONI

Kemm id-distribuzzjoni tal-piż molekulari tal-kampjun kif ukoll il-piżijiet molekulari medji (M_n , M_w) jistgħu jiġu ddeterminati billi jintuża l-GPC. Il-GPC huwa metodu speċjali ta' kromatografija likwida fejn il-kampjun jiġi separat skond il-valuri idrodinamiċi tal-kostitwenti individwali (2).

Is-separazzjoni ssir kif il-kampjun jgħaddi minn ȓo kolonna mimlija b'materjal poruż, tipikament ȓel organiku. Molekoli ȓgħar jistgħu jippenetraw il-pori filwaqt li l-molekoli kbar ma jistgħux. Il-passaȓȓ tal-molekoli kbar huwa, għalhekk, iqsar u għalhekk huma jippenetraw l-ewwel. Il-molekoli ta'daqs medju jippenetraw minn uħud mill-pori u jgħaddu iktar tard. L-iȓgħar molekoli, b'raȓȓ idrodinamiku medju iȓgħar mill-pori tal-ȓel jistgħu jippenetraw il-pori kollha. Dawn ikun eluȓi l-aħħar.

Idealment, is-separazzjoni hija ddeterminata biss skond id-daqs ta' l-ispeċi tal-molekoli, imma fil-prattika huwa diffiċli li wieħed jevita xi interferenza mill-assorbiment L-ippakkjar mhux ugwali tal-kolonni u volumi mejtin jistgħu jaggravaw is-sitwazzjoni (2).

L-osservazzjoni hija effettwata minn, eȓ. l-indiċi refrattiv jew l-assorbiment tal-UV u tagħti kurva tad-distribuzzjoni sempliċi. Madankollu, biex il-kurva tingħata valuri attwali tal-piż molekulari, huwa neċessarju li l-kolonna tiȓi kkalibrata billi polimeri ta' piż molekulari magħruf u, idealment, ta' struttura simili hafna, jitniȓȓu 'l isfel, eȓ. standards tal-polistiren varji. B'mod tipiku, għandha tirriȓulta kurva Gaussian, xi drabi mgħawwȓa minhabba denb fuq in-naha baxxa tal-piż molekulari, fejn il-fus vertikali jindika l-kwantità, skond il-piż, ta' l-ispeċi tal-piż molekulari varji, u l-fus orizzontali l-piż molekulari rreȓistrat.

▼B

Il-kontenut tal-piż molekulari baxx huwa derivat minn din il-kurva. Il-kalkolu jista' jkun eżatt biss jekk l-ispeċi ta' piż molekulari baxx iġibu ruhhom bl-istess mod fuq bażi ta' piż għall-polimer shif.

1.5. KRITERJI TA' KWALITÀ

Ir-ripetibilità (Devjazzjoni ta' Standard Relattiv: RSD) tal-volum ta' l-elużjoni għandha tkun aħjar minn 0,3 %. Ir-ripetibilità mixtieqa ta' l-analiżi għandha tiġi żgurata permezz ta' korrezzjoni skond standard intern jekk kromatogram huwa evalwat b'mod li huwa dipendenti fuq il-hin u ma jaqbilx mal-kriterju msemmi hawn fuq (1). Il-politixrid jiddependi fuq il-piżijiet molekulari ta' l-istandards. Fil-każ ta' standards tal-polisterin, valuri tipiċi huma:

$$M_p < 2\,000 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \qquad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p huwa l-piż molekulari ta' l-istandard fil-quċċata tal-massimu)

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' L-EŻAMINAZZJONI

1.6.1. Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet standard tal-polistirene

L-istandards tal-polisterin huma mahlula permezz ta' tahlit bil-galbu fl-eluwent magħżul. Ir-rakkomandazzjonijiet tal-fabbrikant għandhom jiġu kkunsidrati waqt il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet.

Il-konċentrazzjonijiet ta' l-istandards li ntagħżlu huma dipendenti fuq fatturi varji, eż. il-volum ta' injezzjoni, il-viskożità tas-soluzzjoni u s-sensittività ta' l-indikatur analitiku. Il-volum massimu ta' injezzjoni għandu jiġi adattat għat-tul tal-kolonna, sabiex tiġi evitata t-tagħbija żejda. Il-volumi tipiċi ta' injezzjoni għal separazzjonijiet analitiċi bl-użu ta' GPC b'kolonna ta' 30 cm × 7,8 mm huma normalment bejn 40 u 100 µl. Volumi oġġa huma possibbli, imma m'għandhomx ikunu aktar minn 250 µl. L-aħjar proporzjon ta' volum ta' injezzjoni ma' konċentrazzjoni għandha tiġi ddeterminata qabel il-kalibrazzjoni attwali tal-kolonna.

1.6.2. Preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-kampjun

Bħala prinċipju, l-istess htigijiet japplikaw għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-kampjun. Il-kampjun hu mahlul f'solvent xieraq, e.g. tetraidrofuran (THF), billi jithawwad bil-galbu. Taht l-ebda ċirkustanzi m'għandu jiġi mahlul permezz ta' banju ultrasoniku. Meta meħtieġ, is-soluzzjoni tal-kampjun hija ppurifikata permezz ta' filtru tal-membrana b'daqs tal-pori ta' bejn 0,2 u 2 µm.

Il-preżenza ta' partikoli mhux mahlula għandha tiġi rreġistrata fir-rapport finali peress li dawn jistghu jkunu minhabba speċi ta' piż molekulari għoli. Metodu xieraq għandu jintuża' biex jiġi ddeterminat il-persentaġġ f'piż tal-partikoli mhux mahlula. Is-soluzzjonijiet għandhom jintużaw fi żmien 24 siegħa.

▼B**1.6.3. Korrezzjoni għal kontenut ta' impuritajiet u addittivi**

Korrezzjoni tal-kontenut ta' speċi ta' $M < 1\,000$ għall-kontribuzzjoni minn komponenti speċifiċi mhux polimeri preżenti (eż. impuritajiet u/jew addittivi) hija ġeneralment meħtieġa, sakemm il-kontenut imkejjel mhux diġà $<1\%$. Dan jinkiseb permezz ta' analiżi diretta tas-soluzzjoni polimera jew l-eluzjoni GPC.

F'każijiet fejn l-eluzjoni, wara passaġġ mill-kolonna, hija wisq dilwita għal analiżi ulterjuri, din għandha tiġi kkonċentrata. Jista' jkun hemm il-ħtieġa li l-eluzjoni tiġi evaporata san-nixfa u mahlula mill-ġdid. Konċentrazzjoni ta' l-eluzjoni għandha tiġi miksuba taht kondizzjonijiet li jassiguraw li l-ebda bidliet ma jseħħu fl-eluzjoni. It-trattament ta' l-eluzjoni wara l-pass tal-GPC hu dipendenti fuq il-metodu analitiku użat għad-determinazzjoni kwantitattiva.

1.6.4. Apparat

L-apparat GPC jinkludi l-komponenti li ġejjin:

- reservoir tas-solventi,
- *degasser* (fejn hemm bżonn),
- pompa,
- apparat li jnaqqas l-impuls (fejn hemm bżonn),
- sistema ta' injezzjoni,
- kolonni tal-kromatografija,
- indikatur,
- *flowmeter* (fejn hemm bżonn)
- registratur-proċessur tad-data,
- reċipjent għall-iskart.

Għandu jiġi żgurat li s-sistema GPC hija inerta fir-rigward tas-solventi użati (eż. bl-użu ta' kapillari ta' l-azzar għas-solvent THF).

1.6.5. L-injezzjoni u s-sistema li twassal s-solventi

Volum definit tal-kampjun tas-soluzzjoni jitgħabba fuq il-kolonna bl-użu ta' *auto-sampler* jew manwalment f'żona definita preċiżament. L-irtirar jew l-ghafis tal-*plunger* tas-siringa b'mod mgħaġġel, jekk isir manwalment, jista' jikkawża bidliet fid-distribuzzjoni tal-piż molekulari osservata. Is-sistema tat-twassil tas-solvent għandha, safejn huwa possibbli, tkun hielsa mill-impulsi u idealment għandha tinkludi apparat li jnaqqas l-impulsi. Il-*flowrate* tkun madwar 1 ml/min.

1.6.6. Il-kolonna

Skond il-kampjun, il-polimer ikun karatterizzat mill-użu ta' kolonna sempliċi jew minn numru ta' kolonni konnessi f'sekwenza. Ghadd ta' materjali porużi tal-kolonni bi proprjetajiet definiti (eż. daqs tal-pori, limiti ta' esklużjoni) huma disponibbli kummerċjalment. L-għażla tal-ġel ta' separazzjoni jew tat-tul tal-kolonna jiddependi fuq il-proprjetajiet tal-kampjun (volumi idrodinamiċi, distribuzzjoni tal-piż molekulari) u l-kondizzjonijiet speċifiċi għas-separazzjoni bħas-solventi, t-temperatura u l-*flowrate* (1) (2) (3).

▼B**1.6.7. Il-pjanċi teoretiċi**

Il-kolonna jew il-kombinazzjoni tal-kolonni użati għas-separazzjoni għandhom jiġu karatterizzati skond in-numru ta' pjanċi teoretiċi. Dan jinvolti, f'każ meta t-THF huwa s- solvent eluwent, it-tagħbija ta' soluzzjoni ta' etile benzin jew ta' sustanza mahlula mhux b'polarità xierqa fuq kolonna ta' tul magħruf. In-numru ta' pjanċi teoretiċi huwa mogħti skond l-ekwazzjoni li ġejja:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{or} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

fejn,

N = in-numru tal-pjanċi teoretiċi

V_e = il-volum ta' elużjoni fil-quċcata tal-massimu

W = il-quċcata tal-wisa' tal-linja bażi

$W_{1/2}$ = il-quċcata tal-wisa' fin-nofs ta' l-għoli

1.6.8. L-effiċjenza tas-separazzjoni

Flimkien ma' l-ammont tal-pjanċi teoretiċi, li hija kwantità li tistabbilixxi il-*bandwidth*, l-effiċjenza tas-separazzjoni għandha sehem ukoll, u din hija stabbilita skond kemm hi wieqfa l-kurva tal-kalibrazzjoni. L-effiċjenza tas-separazzjoni ta' kolonna tinkisebskond ir-relazzjoni li ġejja:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

fejn,

V_{e, M_x} = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari M_x

$V_{e,(10.M_x)}$ = il-volum ta' elużjoni għall-polistiren b'piż molekulari ta' għaxar darbiet iktar

Ir-riżoluzzjoni tas-sistema hija normalment definita kif ġej:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

fejn,

V_{e1}, V_{e2} = il-volumi ta' elużjoni taż-żewġ standards tal-polistiren fil-quċcata tal-massimu

W_1, W_2 = il-quċcata tal-wisat tal-linji ta' bażi

M_1, M_2 = il-piżijiet molekulari fil-quċcata tal-massimu (għandu jkun hemm differenza b' fattur ta' 10)

Il-valur R għas-sistema tal-kolonni għandu jkun ikbar minn 1,7 (4).

▼B**1.6.9. Solventi**

Is-solventi kollha għandhom ikollhom purità għolja (għat-THF tintuża purità ta' 99,5 %). Id-depożitu tas-solventi (l-atmosfera ta' gass inert, jekk huwa neċessarju) għandu jkun kbir biżżejjed għall-kalibrazzjoni tal-kolonna u għal diversi analiżijiet tal-kampjuni. Il-gass għandu jitneħħa mis-solvent qabel ma jgħaddi għall-kolonna minn go pompa.

1.6.10. Kontroll tat-temperatura

It-temperatura tal-komponenti kruċjali interni (iċ-ċirku ta' injezzjoni (*injection loop*), il-kolonna, id-ditekter, u t-tubi) għandha tkun kostanti u konsistenti skond l-għażla tas-solvent.

1.6.11. Ditekter

Il-funzjoni tad-ditekter hija li jirreġistra b'mod kwantitattiv il-koncentrazzjoni tal-kampjun li gie elwat mill-kolonna. Biex jiġi evitat li l-quċċati jitwessgħu, il-volum tal-*cuvette* taċ-ċellula tad-ditekter għandu jinżamm żgħir kemm jista' jkun. M'għandux ikun akbar minn 10 μ l hliet għal ditekters li jxerrdu d-dawl u għal ditekters tal-viskożità. Normalment tintuża rifrattometrija differenzjali għall-osservazzjoni. Madankollu, jekk mehtieg mill-proprjetajiet speċifiċi tal-kampjun jew tas-solvent ta' elużjoni, jistgħu jintużaw ditekters ohrajn, eż. UV/VIS, IR, ditekters tal-viskożità, eċċ.

2. DATA U RAPPORTAR**2.1. DATA**

L-istandard DIN (1) għandu jiġi kkonsultat għall-kriterji ta' valutazzjoni dettaljata kif ukoll għall-kondizzjonijiet għall-għbir u għall-proċessar ta' DATA.

Għal kull kampjun għandhom isiru żewġ esperimenti indipendenti. Għandhom jiġu analizzati individwalment. Fil-każijiet kollha hu essenjzjali li tiġi ddeterminata wkoll DATA minn *blanks*, ittrattati taht l-istess kondizzjonijiet tal-kampjun.

Huwa mehtieg li jiġi indikat b'mod esplicitu li l-valuri mkejla huma valuri relattivi ekwivalenti għall-piż molekulari ta' l-istandard użat.

Wara determinazzjoni tal-volumi taż-żamma jew tal-hinijiet taż-żamma (possibilmint ikkoreġuti bl-użu ta' standard intern), valuri $\log M_p$ (M_p meqjus bħala l-ogħla quċċata ta' l-istandard tal-kalibrazzjoni) jitniżżlu hdejn wahda minn dawn il-kwantitajiet. Mill-inqas żewġ punti ta' kalibrazzjoni huma mehtiega għal kull sett ta' għaxxa piżijiet molekulari, u mill-inqas ħames punti ta' kejl huma mehtiega għall-kurva totali, li għandha tkopri l-piż molekulari stmat għall-kampjun. Il-punt ta' tmiem baxx tal-piż molekulari tal-kurva ta' kalibrazzjoni huwa mfisser minn *n-hexyl* benzin jew minn soluzzjo-nimahlula mhux polari ohra xierqa. Il-porzjon tal-kurva li jikkorrispondi għall-piż molekulari taht 1 000 huwa ddeterminat u kkoreġut kif mehtieg għall-impuritajiet u l-addittivi. Il-kurvi ta' l-elużjoni huma ġeneralment stmati permezz ta' l-ipproċessar elettroniku tad-DATA. Fil-każ li tintuża digitazzjoni manwali, ASTM D 3536-91 jista' jiġi kkonsultat (3).

▼B

Jekk kwalunkwe polimer li ma jinhallx jinżamm fil-kolonna, il-piż molekulari tiegħu x'aktarx li jkun oghla minn dak tal-frazzjoni li tinhall, u jekk ma jiġix ikkunsidrat jista' jirriżulta fi stima eċċessiva tal-kontenut tal-piż molekulari baxx. Gwida għall-korrezzjoni tal-kontenut tal-piż molekulari baxx għall-polimer li ma jinhallx hija prevista fl-Anness.

Il-kurva tad-distribuzzjoni għandha tiġi pprovduta f'forma ta' tabella jew figura (frekwenza differenzjali jew persentaġġi tas-somom ma' log M). Fir-rappreżentazzjoni grafika, sett wiehed ta' għaxar piżijiet molekulari huwa normalment wiesa' 4 cm u l-massimu tal-quċċata għandu jkun twil xi 8 cm. F'każ ta' kurvi tad-distribuzzjoni integrali, d-differenza fil-koordinat bejn 0 u 100 % għandha tkun ta' xi 10 cm.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

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

2.2.1. Sustanza tat-test

- informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test (identità, addittivi, impuritajiet),
- deskrizzjoni tat-trattament tal-kampjun, osservazzjonijiet, problemi.

2.2.2. Strumentazzjoni

- kontenitur ta' l-eluwent, gass inert, tneħħija ta' gass żejjed ta' l-eluwent, kompożizzjoni ta' l-eluwent, impuritajiet,
- pompa, apparat li jnaqqas il-polz, sistema ta' injezzjoni,
- kolonni tas-separazzjoni (il-fabbrikant, l-informazzjoni kollha dwar il-karatteristiċi tal-kolonni bħad-daqs tal-pori, it-tip ta' materjal ta' separazzjoni eċċ., in-numru, it-tul u l-ordni tal-kolonni użati),
- numru ta' pjanci teoretiċi tal-kolonni (jew kombinazzjoni), effiċjenza tas-separazzjoni (riżoluzzjoni tas-sistema).
- informazzjoni dwar is-simetrija tal-quċċati,
- temperatura tal-kolonni, tip ta' kontroll tat-temperatura,
- indikatur (prinċipju tal-kejl, tip, *cuvette*, volum),
- *flowmeter* jekk użat (il-fabbrikant, il-prinċipju tal-kejl),
- sistema għar-registrazzjoni u proċessar tad-DATA (*hardware* u *software*)

2.2.3. Kalibrazzjoni tas-sistema

- deskrizzjoni dettaljata tal-metodu użat biex tinbena l-kurva tal-kalibrazzjoni,

▼B

- informazzjoni dwar il-kriterji ta' kwalità ta' dan il-metodu (eż. koeffiċjent tal-korrelazzjoni, *error sum of squares* eċċ.),
- informazzjoni dwar l-estrapolazzjonijiet, l-assunzjonijiet u l-approssimazzjonijiet li saru waqt il-proċedura sperimentali u l-valutazzjoni u l-proċessar tad-DATA,
- il-kejl kollu użat għall-konstruzzjoni tal-kurva ta' kalibrizzjoni għandu jġi dokumentat f'tabella li tinkludi l-informazzjoni li ġejja għal kull punt ta' kalibrizzjoni:
 - l-isem tal-kampjun,
 - il-fabbrikant tal-kampjun,
 - il-valuri karatteristiċi ta' l-istandards M_p , M_n , M_w u M_w/M_n , kif ipprovduti mill-fabbrikant jew kif miġjuba minn kejl sussegwenti, flimkien ma' dettalji dwar il-metodu ta' determinazzjoni,
 - il-volum ta' l-injezzjoni u l-konċentrazzjoni ta' l-injezzjoni,
 - il-valur M_p użat għall-kalibrizzjoni,
 - il-valur ta' l-elużjoni jew il-hin taż-żamma kkoreġut imkejjel fl-oghla punt massimu,
 - l- M_p kkalkulat fl-oghla punt massimu,
 - il-persentaġġ ta' żball ta' l- M_p kkalkulat u l-valur tal-kalibrizzjoni.

2.2.4. **Informazzjoni dwar il-kontenut polimeru ta' piż molekulari baxx**

- deskrizzjoni tal-metodi użati fl-analizi u l-mod li bih twettqu l-esperimenti;
- informazzjoni dwar il-persentaġġ ta' kontenut ta' speċi ta' piż molekulari baxx (w/w) relatat mal-kampjun totali,
- informazzjoni dwar impuritajiet, addittivi u speċi oħra mhux polimeri f'persentaġġ f'piż relatat mal-kampjun totali.

2.2.5. **Valutazzjoni:**

- valutazzjoni fuq bażi ta' hin: il-metodi użati biex tkun żgurata r-riproduzzjoni mehtieġa (metodu ta' korrezzjoni, standard intern, eċċ.),
- informazzjoni dwar jekk l-istima gietx affettwata fuq il-bażi tal-volum ta' l-elużjoni jew il-hin taż-żamma,
- informazzjoni dwar il-limiti tal-valutazzjoni jekk quċcata mhijiex analizzata kompletament,
- deskrizzjoni ta' metodi li jneħħu x-xkiel, jekk użati,
- proċeduri ta' preparazzjoni u trattament minn qabel tal-kampjun,
- il-preżenza ta' partikoli mhux mahlulin, jekk hemm,

▼B

- il-volum ta' l-injezzjoni (μ l) u l-koncentrazzjoni ta' l-injezzjoni (mg/ml),
- osservazzjonijiet li jindikaw effetti li jwasslu għal devjazzjonijiet mill-profil GPC ideali,
- deskrizzjoni dettaljata tal-modifikazzjonijiet kollha fil-proċeduri ta' l-ittestjar,
- dettalji ta' l-iskali ta' żbalji,
- kwalunkwe informazzjoni oħra u osservazzjonijiet rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati,

3. **REFERENZI**

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Appendiċi

Gwida għall-korrezzjoni tal-kontenut molekulari baxx għall-preżenza ta' polimeri insolubbli

Meta hemm polimer insolubbli f'kampjun, dan jirriżulta f'telf tal-piż matul l-analiżi GPC. Il-polimer insolubbli jinżamm b'mod irriversibbli fuq il-kolonna jew il-filtru tal-kampjun waqt li l-porzjon solubbli tgħaddi mill-kolonna. Fil-każ fejn iż-żieda fl-indiċi rifrattiva (dn/dc) tal-polimer tista' tkun stmata jew imkejla, wiehed jista' jistma' l-piż tal-kampjun mitluf fuq il-kolonna. F'dak il-każ, wiehed jagħmel korrezzjoni bl-użu ta' kalibrazzjoni esterna b'materjali standard ta' konċentrazzjoni magħrufa u dn/dc magħruf sabiex ikun ikkalibrat ir-reazzjoni tar-rifraktometru. Fl-eżempju hawn taht jintuza standard *poly(methyl methacrylate)* (pMMA).

Fil-kalibrazzjoni esterna għall-analiżi ta' polimeri akriliċi, standard pMMA ta' konċentrazzjoni magħrufa fit-tetraidrofuran, jiġi analizzat bil-GPC u d-data li tirriżulta tintuza biex jinsab il-kostanti tar-rifraktometru skond l-ekwazzjoni:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

fejn:

K = il-kostanti tar-rifraktometru (f'microvolt second/ml),

R = it-twegiba ta' l-istandard pMMA (f'microvolt/second),

C = il-konċentrazzjoni ta' l-istandard pMMA (f'mg/ml),

V = il-volum ta' l-injezzjoni (f'ml) u

dn/dc = iż-żieda fl-indiċi rifrattiv għall-pMMA f'tetraidrofuran (f'ml/mg).

The following data are typical for a pMMA standard:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Il-valur K li jirriżulta, $3,05 \times 10^{11}$ imbagħad jintuza biex tkun ikkalkulata r-reazzjoni teoretika tad-ditektek jekk 100 % tal-polimer injettat kien elwat permezz tad-ditektek.

▼B**A.20. L-IMĠIBA TAS-SOLUZZJONI/TA' L-ESTRAZZJONI TA' POLIMERI FL-ILMA****1. METODU**

Il-metodu deskritt huwa repetizzjoni tal-verzjoni reveduta ta' l-OECD TG 120 (1997). Aktar informazzjoni teknika tinghata bhala referenza (1).

1.1. DAHLA

Ghal ċerti polimeri, bhall-polimeri ta' emulsjoni, xoghol ta' preparazzjoni inizjali jista' jkun mehtieg qabel ma jista' jintuza' l-metodu stab-bilit minn hawn 'il quddiem. Il-metodu mhuwiex applikabbli ghal polimeri likwidi u ghal polimeri li jirreagixxu ma' l-ilma taht il-kondizzjonijiet ta' l-ittestjar.

Meta l-metodu mhuwiex prattiku jew mhuwiex possibbli, l-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tista' tiġi investigata permezz ta' metodi oħrajn. F'kazijiet bhal dawn, dettalji shah u ġustifikazzjoni shiha ghandhom jinghataw għall-metodu użat.

1.2. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

L-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni ta' polimeri f'sustanza ta' l-ilma hija ddeterminata bl-użu tal-metodu tal-flixxkun (ara A.6 is-solubilità fl-ilma, metodu tal-flixxkun) bil-modifikazzjonijiet deskritti hawn taht.

1.4. KRITERJI TA' KWALITÀ

Xejn.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR**1.5.1. Apparat**

L-apparat li ġej hu mehtieg għall-metodu:

- mezz ta' tifrik, eż. mola għall-produzzjoni ta' partikoli ta' daqs magħruf,
- apparat għat-thawwid bil-possibiltà ta' kontroll tat-temperatura,
- sistema ta' l-iffiltrar tal-membrana,
- apparat analitiku xieraq,
- għarbiela standardizzati.

1.5.2. Preparazzjoni tal-kampjun

Kampjun rappreżentattiv għandu l-ewwel jitnaqqas sa daqs ta' partikolu bejn 0,125 u 0,25 mm bl-użu ta' għarbiela xierqa. Jista' jkun mehtieg tkessih għall-istabbiltà tal-kampjun jew għall-proċess tad-thin. Materjali ta' natura li tixbah il-lastiku jistgħu jifarrku fit-temperatura tan-nitroġenu likwidu (1).

Jekk il-frazzjon tad-daqs tal-partikolu mehtieg ma jistax jinkiseb, għandha tittiehed azzjoni biex kemm jista' jkun jitnaqqas id-daqs tal-partikoli u r-riżultat jiġi rrapportat. Fir-rapport, huwa mehtieg li jiġi indikat il-mod li bih il-kampjun imfarrak kien maħzun qabel it-test.

▼B

1.5.3. **Proċedura**

Tliet kampjuni ta' 10g tas-sustanza tat-test jintiżnu f'kull wiehed minn tliet kontenituri li għandhom *stopper* tal-ħġieġ u jiżdiendu 1 000 ml ta' ilma f'kull kontenitur. Jekk it-trattament ta' ammont ta' polimeru ta' 10 g jidher li mhuwiex prattikabbli, l-ogħla ammont li jmiss li jista' jiġi ttrattat għandu jintuża u l-volum ta' ilma jiġi aġġustat skond dan.

Stoppers jitqiegħdu fuq il-kontenituri u jiġu ssikkati u mbgħad jithawdu f'temperatura ta' 20 °C. Għandu jintuża apparat ta' ċaqliq jew thawwid li kapaċi jahdem f'temperatura kostanti. Wara perjodu ta' 24 siegħa, il-kontenut ta' kull kontenitur huwa ċċentrifugat u ffiltrat u l-konċentrazzjoni ta' polimer fil-fażi ċara ta' l-ilma hija ddeterminata permezz ta' metodu analitiku xieraq. Jekk metodi analitiċi xierqa għall-fażi ta' l-ilma mhumiex disponibbli, is-solubilità/l-estrattività totali tista' tiġi stmata mill-piż niexef tar-residwu tal-filtru jew tal-precipitat iċċentrifugat.

Is-soltu ikun hemm il-htieġa li jkun hemm differenza kwantitattiva bejn l-impuritàjiet u l-addittivi min-naħa l-waħda u l-ispeċi ta' piż molekulari baxx min-naħa l-oħra. Fil-każ ta' determinazzjoni gravimetrika, huwa importanti wkoll li titwettag prova blank mingħajr sustanza għat-test sabiex jinkiseb għarfien dwar residwi li ġejjin mill-proċedura esperimentali.

L-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni ta' polimeri fl-ilma f'temperatura ta' 37 °C f'pH 2 u pH 9 tista' tiġi ddeterminata bl-istess mod kif deskritt fit-tweġġ ta' l-esperiment f'temperatura ta' 20 °C. Il-valuri tal-pH jistgħu jinkisbu biż-żieda jew sustanzi ta' protezzjoni xierqa jew ta' aċidi jew ta' bażi xierqa bħal aċidu idrokloriku, aċidu aċetiku, sodju ta' grad analitiku jew idrossidu tal-potassju jew NH₃.

Skond il-metodu ta' analiżi użat, għandhom jitwettqu test wiehed jew żewġ testijiet. Meta metodi speċifiċi biżżejjed ikunu disponibbli għall-analiżi diretta tal-fażi ta' l-ilma għall-komponent tal-polimer, test wiehed kif deskritt hawn fuq għandu jkun biżżejjed. Madankollu, meta dawn il-metodi mhumiex disponibbli u d-determinazzjoni ta' l-imġiba tas-soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tal-polimer hija limitata għall-analiżi indiretta billi jiġi iddeterminat biss il-kontenut totali ta' karbonju organiku (TOC) ta' l-estratt ta' l-ilma, test addizzjonali għandu jitwettaq. Dan it-test addizzjonali għandu wkoll jsir tliet darbiet, bl-użu ta' kampjuni ta' polimeri li huma 10 darbiet iżgħar u bl-istess ammonti ta' ilma użati fl-ewwel test.

1.5.4. **Analiżi**1.5.4.1. *Test imwettaq b'daqs wiehed ta' kampjun*

Jista' jkun hemm metodi disponibbli għall-analiżi diretta ta' komponenti polimeri fil-fażi ta' l-ilma. Inkella, analiżi indiretta ta' komponenti polimeri mahlula/estratti, permezz tad-determinazzjoni tal-kontenut totali ta' partijiet li jinhallu u l-korrezzjoni għal komponenti polimeri mhux speċifiċi, tista' wkoll tiġi kkunsidrata.

Analiżi tal-fażi ta' l-ilma għall-ispeċi polimerika totali hija possibbli:

jew permezz ta' metodu sensitiv biżżejjed, eż.

— TOC li tuża diġestjoni ta' persulfat jew dikromata biex tagħti CO₂ segwita bi stima permezz ta' IR jew ta' analiżi kimika,

▼B

— spettrometrija atomika ta' l-assorbiment (AAS) jew l-emissjoni tal-plasma tagħha magħquda b'mod induttiv (ICP) ekwivalenti għal silikone jew polimer li jkun fih il-metall,

— assorbiment ta' l-UV jew spettrofluorimetrija għall-polimeri *aryl*,

— LC-MS għal kampjuni ta' piż molekulari baxx.

jew permezz ta' evaporazzjoni b'vakwu san-nixfa ta' l-estratt ta' l-ilma u analizi spettroskopika (IR, UV, eċċ.) jew AAS/ICP tar-residwu.

Jekk analizi tal-fażi ta' l-ilma fiha nnifisha mhijiex prattikabbli, l-estratt ta' l-ilma għandu jiġi estratt b'solvent organiku li ma jistax jithallat ma' l-ilma, eż. idrokarbonju klorinat. Is-solvent huwa mbaġħad evaporat u r-residwu huwa analizzat kif imsemmi hawn fuq għall-kontenut polimeru notifikat. Kwalunkwe komponenti f'dan ir-residwu li huma identifikati bħala impuritajiet jew addittivi għandhom jitnaqqsu għall-iskop tad-determinazzjoni tal-grad ta' soluzzjoni/ta' l-estrazzjoni tal-polimer nnifsu.

Meta kwantitajiet relattivament kbar ta' dawn il-materjali huma preżenti, jista' jkun meħtieġ li r-residwu jiġi soġġett għal, eż. analizi HPLC jew GC biex jiġu differenzjati l-impuritajiet preżenti li ġejjin mill-ispeċi monomeri jew li ġejjin mill-monomeri sabiex il-kontenut veru ta' dawn ta' l-aħħar jista' jiġi ddeterminat.

F'xi każijiet, jista' jkun suffiċjenti li ssir evaporazzjoni sempliċi tas-solvent organiku san-nixfa u li jintiżen ir-residwu niexef.

1.5.4.2. *Test imwettaq b'żewġ daqsijiet differenti ta' kampjun*

L-estratti ta' l-ilma kollha huma analizzati għat-TOC.

Determinazzjoni gravimetrika titwettaq fuq il-parti mhux mahlula/mhux estratta tal-kampjun. Jekk, wara ċ-centrifugazzjoni jew l-iffiltrar tal-kontenut ta' kull kontenitur, residwi polimeri jibqgħu mwahhlin mal-ħajt tal-kontenitur, il-kontenitur għandu jitlahlah bil-filtrat sa kemm il-kontenitur jitnaddaf mir-residwi viżibbli kollha. Wara dan, il-filtrat huwa ċ-centrifugat jew iffiltrat għal darb'ohra. Ir-residwi li jibqgħu fuq il-filtru jew fit-tubu taċ-centrifugu jitnixxfu f'temperatura ta' 40 °C taht vakwu u jintiżnu. It-tnixxif jitkompla sakemm jintlahaq piż kostanti.

2. DATA

2.1. TEST IMWETTAQ B'DAQS WIEHED TAL-KAMPJUN

Ir-rizultati individwali għal kull wiehed mit-tliet flieken u l-valuri medji għandhom jingħataw u għandhom ikunu espressi f'unitajiet ta' piż għal kull volum tas-soluzzjoni (tipikament mg/l) jew piż għal kull piż ta' kampjun tal-polimeru (tipikament mg/g). Barra dan, it-telf ta' piż tal-kampjun (ikkalkulat bħala l-piż tas-sustanza mahlula mnaqqsa mill-piż tal-kampjun inizjali) għandu wkoll jingħata. Id-devjazzjonijiet relattivi standard (RSD) għandhom jiġu kkalkulati. Figuri individwali għandhom jingħataw għas-sustanza totali (polimer + addittivi essenzjali, eċċ.) u għall-polimer biss (jiġifieri wara t-tnaqqis tal-kontribuzzjoni minn dawn l-addittivi).

▼B**2.2. TEST IMWETTAQ B'ŻEWĠ DAQSIJET DIFFERENTI TAL-KAMPJUN**

Il-valuri TOC individwali ta' l-estratt ta' l-ilma taż-żewġ esperimenti ripetuti għal tliet darbiet u l-valur medju għal kull esperiment għandu jingħata espress bħala unità ta' piż għal kull volum ta' soluzzjoni (tipikament mgC/l), kif ukoll f'unità ta' piż għal kull piż tal-kampjun inizjali (tipikament mgC/g).

Jekk m'hemm l-ebda differenza bejn ir-riżultati fil-proporzjonijiet għolja u baxxi tal-kampjun/ilma, dan jista' jindika li l-komponenti li setgħu jiġu estratti kienu fil-fatt estratti kollha. F'dan il-każ, analiżi diretta m'għandhiex normalment tkun mehtieġa.

Il-piżijiet individwali tar-residwi għandhom jingħataw u jiġu espressi f'persentaġġ tal-piżijiet inizjali tal-kampjuni. Il-medji għandhom jiġu kkalkulati għal kull esperiment. Id-differenzi bejn 100 u l-persentaġġi li nstabu jirrapprezentaw il-persentaġġi ta' materjal li jinhall u li jista' jiġi estratt fil-kampjun oriġinali.

3. RAPPORTAR**3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST**

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

3.1.1. Is-sustanza għat-test

— informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza għat-test (identità, addittivi, impuritajiet, kontenut ta' speċi ta' piż molekulari baxx).

3.1.2. Kondizzjonijiet sperimentali

— deskrizzjoni tal-proċeduri użati u kondizzjonijiet sperimentali,
— deskrizzjoni tal-metodi analitiċi u ta' osservazzjoni.

3.1.3. Riżultati

— riżultati tal-kapaċità li jinhall/jiġi estratt f'mg/l; valuri medji u individwali għat-testijiet ta' l-estrazzjoni fis-soluzzjonijiet varji, imqassmin f'kontenut polimeru u impuritajiet, addittivi, eċċ.,
— riżultati tal-kapaċità li jinhall/jiġi estratt f'mg/g ta' polimer,
— valuri TOC ta' estratti ta' l-ilma, piż tas-sustanza li tinhall u l-persentaġġi kkalkulati, jekk imkejlin,
— il-pH ta' kull kampjun,
— informazzjoni dwar il-valuri vojta,
— fejn mehtieġ, referenzi għall-instabilità kimika tas-sustanza tat-test, kemm matul il-proċess ta' l-ittestjar kif ukoll il-proċess analitiku,
— l-informazzjoni kollha li hija importanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. REFERENZI

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststoffserzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B**A.21. PROPRJETAJIET OSSIDIZZANTI (LIKWIDI)****1. METODU****1.1 INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu tat-test huwa ddisinjat sabiex ikejjel il-potenzjal ta' sustanza likwida li żżid ir-rata tal-hruq jew l-intensità tal-hruq ta' sustanza kombustibbli, jew li tiffirma tahlita ma' sustanza kombustibbli li tiegħu n-nar b'mod spontanju, meta it-tnejn ikunu kompletament imhallta. Dan huwa bbażat fuq it-test tan-NU dwar likwidi ossidizzanti (1) u huwa ekwivalenti għalih. B'danakollu, minhabba li dan il-metodu A.21 huwa primarjament iddisinjat biex jissodisfa l-htigijiet tar-Regolament 1907/2006, huwa mehtieg il-paragun ma' sustanza ta' referenza waħda. It-testijiet u l-paragun ma' sustanzi addizzjonali ta' referenza jistgħu jkunu mehtieġa meta jkun mistenni li r-riżultati tat-test se jintużaw għal skopijiet oħrajn. ⁽¹⁾

Dan it-test mhux bil-fors li jitwettaq meta l-eżami tal-formula struttrali jstabbilixxi lil hinn minn kull dubbju raġjonevoli li s-sustanza ma jstax ikollha reazzjoni eżotermika ma' materjal kombustibbli.

Huwa utli li jkun hemm informazzjoni preliminarja dwar il-potenzjal tal-proprjetajiet esplożivi tas-sustanza qabel ma jitwettaq it-test.

Dan it-test mhux applikabbli għal solidi, gassijiet, sustanzi li huma ferm fjamabbli jew splussivi, jew perossidi organiċi.

Dan it-test jista' ma jsirx meta r-riżultati tas-sustanza għat-test fit-test tan-NU għal likwidi ossidanti (1) ikunu diġà disponibbli.

1.2 DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Iż-zieda fil-hin tal-pressure medja hija l-medja tal-hinijiet imkejla għal tahlita li tkun għat-test sabiex tipproduċi zieda fil-pressure minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar minn dik atmosferika.

1.3 SUSTANZA TA' REFERENZA

65 % (w/w) aċidu nitriku fl-ilma (grad analitiku) huwa mehtieġ bħala sustanza ta' referenza ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Kif, per eżempju, muri fil-kwadru tar-regolamenti ta' trasport tan-NU.

⁽²⁾ L-aċidu għandu jiġi ttitrat qabel it-test sabiex tiġi kkonfermata l-konċentrazzjoni tiegħu.

▼B

L-aħjar, jekk l-esperiment jipprevedi li r-riżultati ta' dan it-test jistgħu eventwalment ikunu użati għal skopijiet oħrajn ⁽¹⁾, l-ittestjar ta' sustanzi ta' referenza addizzjonali jista' jkun xieraq ukoll ⁽²⁾.

1.4 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-likwidu għat-test jithawwad fi proporzjon ta' 1: 1, bil-piż, ma' ċellulożi fibruża u jiġi introdott f'reċipjent ta' pressjoni. Jekk waqt it-tahlit jew waqt il-mili jaqbad b'mod spontanju, l-ebda test iehor ma jkun mehtieg.

Jekk ma jaqbadx b'mod spontanju it-test kollu għandu jitwettaq. It-tahlita tisaħhan f'reċipjent ta' pressjoni u l-hin medju jkun irreggistrat għall-pressjoni li titla' minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar mill-pressjoni atmosferika. Dan jitqabbel maż-żieda fil-hin tal-pressjoni medja għat-tahlita 1: 1 tas-sustanza(i) ta' referenza u ċ-ċellulożi.

1.5 KRITERJA TA' KWALITÀ

F'serje ta' hames provi fuq sustanza wahda l-ebda riżultat m'għandu jiddifferixxi b'aktar minn 30 % mill-medja aritmetika. Ir-riżultati li jiddifferixxu b'aktar minn 30 % minn dik il-medja għandhom jitwarbu, il-proċedura tat-tahlit jew tal-mili tittejjeb u t-test jiġi ripetut.

1.6 DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.6.1 Preparazzjoni

1.6.1.1 *Sustanza kombustibbli*

Sustanza xotta, fibruża, biċ-ċellulożi b'fibra b'tul ta' bejn 50 u 250 µm u dijametru medju ta' 25 µm, ⁽³⁾ tintuża bhala l-materjal kombustibbli. Din titnixxef għal piż kostanti f'saff ta' mhux aktar minn 25 mm h'xuna f'105 °C għal 4 sigħat u tinzamm f'dessikatur, bid-dessikant, sakemm tibred u tkun mehtieġa għall-użu. Il-kontenut ta' l-ilma taċ-ċellulożi xotta għandu jkun anqas minn 0,5 % f'piż xott ⁽⁴⁾. Jekk mehtieġ, il-hin tat-tnixxif għandu jittawwal sabiex jintlaħaq dan il-livell ⁽⁵⁾. L-istess lott ta' ċellulożi għandu jintuża matul it-test kollu.

⁽¹⁾ Kif, per eżempju, muri fil-kwadru tar-regolamenti ta' trasport tan-NU.

⁽²⁾ Eż.: 50 % (w/w) aċidu perkloriku u 40 % (w/w) klorat tas-sodju jintużaw f'referenza 1.

⁽³⁾ eż. Trab taċ-Ċelluloża għal — Kolonni tal-Kromatografija Whatman CF11, nru tal-katalgu 4021050.

⁽⁴⁾ Konfermat minn (eż.) titrazzjoni Karl-Fisher.

⁽⁵⁾ Alternattivament, dan il-kontenut ta' ilma jista' jintlaħaq (eż.) b'tishin f'105 °C taht vakwu għal 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Apparat*

1.6.1.2.1 Reċipjent ta' pressjoni

Reċipjent ta' pressjoni huwa mehtieg. Ir-reċipjent jikkonsisti minn reċipjent ċilindriku ta' pressjoni ta' l-azzar 89 mm tul u 60 mm dijametru estern (ara l-figura 1). Żewġ pjanċi huma msawwra b'magna fuq in-nahat opposti (il-*cross section* tar-reċipjent b'hekk tonqos għal 50 mm) sabiex ikun iffacilitat it-twahhil tal-plagg li jqabba u tat-tapp tal-vent. Ir-reċipjent, b'ċirkonferenza interna ta' 20 mm u ribattut f'kull tarf għall-fond ta' 19 mm u b'kamin li jaċċetta 1" *British Standard Pipe* (BSP) jew l-ekwivalenti metriku. It-*take-off* tal-pressjoni, fl-għamla ta' driegħ laterali, tiġi invitata fuq il-wiċċ tal-kurva tar-reċipjent ta' pressjoni, 35 mm minn tarf wiehed u 90° mill-pjanċi msawwra b'magna. Il-plagg għal dan jithaffer għal fond ta' 12 mm u jingħata l-kamin sabiex jaċċetta 1/2" BSP (jew metriku ekwivalenti) fit-tarf l-iehor tad-driegħ. Jekk mehtieg, sigill inert jitwahhal sabiex jassigura sigill li ma jgħaddix gass minnu. Id-driegħ tal-ġenb jestendi għall-55 mm lil hinn mil-qafas tar-reċipjent ta' pressjoni u jkollu hofra interna ta' 6 mm. It-tarf tad-driegħ tal-ġenb ikun ribattut u jkollu kamin sabiex jaċċetta *transducer* tal-pressjoni tat-tip bid-dijaframma. Kwalunkwe apparat li jkejjel il-pressjoni jista' jintuża basta dan ma jkunx effettwat minn gassijiet sħan jew minn dikompożizzjoni ta' prodotti u jkun kapaci jirrispondi għal rati ta' zieda fil-pressjoni ta' 690-2 070 kPa f'mhux aktar minn 5ms.

It-tarf l-aktar 'il bogħod mid-driegħ tal-ġenb tar-reċipjent ta' pressjoni jingħalaq bi plagg li jqabba u li jkun mghammar b'zewg elettrodi, wahda insulata minn ġewwa, u l-oħra mwahhla ma' l-*earth*, mal-plagg taċ-ċilindru. It-tarf l-iehor tar-reċipjent ta' pressjoni jingħaluq b'disk li tinfaqa' (pressjoni tat-tifqigh ta' madwar 2 200 kPa) miżmuma fil-post b'plagg li jżomm li jkollu hofra ta' 20 mm. Jekk mehtieg, sigill inert jintuża mal-plagg li jqabba sabiex jiżgura rabta tajba li ma jgħaddix gass minnha. Stend ta' frid (il-figura 2) iservi sabiex iżomm l-immuntar fil-pożizzjoni t-tajba matul l-użu. Dan normalment ikun jinkludi pjanċa ta' l-azzar artab b'kejl ta' 235 mm × 184 mm × 6 mm u 185 mm tul b'sezzjoni kwadra mhaffra (S.H.S.) 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Sezzjoni tkun maqtugħa minn kull wiehed mill-ġnub opposti fit-tarf ta' l-S.H.S. hekk li tirriżulta struttura b'zewġ saqajn bil-ġenb ċatti li fuqha tistrieħ *box section* intatta b'tul ta' 86 mm. It-truf ta' dawn il-ġnub ċatti huma maqtugħa għal angolu ta' 60° mal-lat orizzontali u iwweldjati mal-pjanċa tal-qiegh. Qasma bil-kejl ta' 22 mm wisa' x 46 mm fond tinqata' b'mod mekkaniku fuq naħa wahda fit-tarf ta' fuq tas-sezzjoni tal-qiegh hekk li l-immuntar tar-reċipjent ta' pressjoni jitnizzel, it-tarf tal-plagg li jqabba jiddahhal l-ewwel, fil-*box section* ta' l-irfid tas-sezzjoni, bid-driegħ tal-ġenb akkomodat f'dik il-qasma. Biċċa azzar 30 mm wisa' u 6 mm huxna tkun iwweldjata mal-wiċċ intern l-aktar baxx tas-sezzjoni tal-*box section* sabiex taġixxa bhala *spacer*. Żewġ skorfini *butterfly*, bil-kamin fuq il-wiċċ oppost, iservu sabiex iżommu r-reċipjent ta' pressjoni f'pożizzjoni soda. Żewġ strippli 12 mm wisa' magħmulin minn azzar ta' 6 mm huxna, iwweldjati mal-biċċiet tal-ġenb li johorġu mill-bażi tal-*box section*, jirfidu r-reċipjent tal-pressjoni minn taht.

▼B

1.6.1.2.2 Sistema li tagħti n-nar

Is-sistema li tagħti n-nar tikkonsisti minn wajer ta' Ni/Cr twil 25 cm b'dijametru ta' 0,6 mm u b'reżistenza ta' 3,85 ohm/m. Il-wajer jinbaram, bl-użu ta' virga b'dijametru ta' 5 mm, f'għamla ta' romblu u jintrabat ma' l-elettrodi tal-plagg li jqabba. Ir-romblu għandu jkollu waħda mill-konfigurazzjonijiet murija fil-figura 3. Id-distanza bejn il-qiegħ tar-reċipjent u l-parti t'isfel tar-romblu li jqabba għandha tkun 20 mm. Jekk l-elettrodi ma jkunux aġġustabbli, it-trufijiet tal-wajer li jqabba bejn ir-romblu u l-qiegħ tar-reċipjent għandhom ikunu insulati b'kisja taċ-ċeramika. Il-fil jissahhan b'kurrent kostanti ta' l-elettriku li jista' jforni mill-anqas 10 A.

1.6.2 It-tweqqif tat-test⁽¹⁾

L-apparat, immuntat kollu kemm hu bit-*transducer* tal-pressjoni u s-sistema tas-shana imma mingħajr il-plattina li tinfaqa', huwa mirfud bit-tarf tal-plagg li jqabba fin-naħa t'isfel, 2,5 g mill-likwidu tat-test jithallat ma' 2,5 g taċ-ċelluloża minn *beaker* tal-ħġieġ bl-użu ta' virga tal-ħġieġ għat-thawwid⁽²⁾. Bħala prekawzjoni kontra l-periklu, it-thawwid għandu jitwettaq wara tarka tas-sikurezza bejn l-operatur u t-tahlita. Jekk it-tahlita taqbad matul it-thawwid jew waqt il-mili, il-kumplement tat-test mhux meħtieġ. It-tahlita tiżdied, fi porzjonijiet żgħar u bit-taptip, fir-reċipjent tal-pressjoni waqt li jkun żgurat li t-tahlita tkun ippakkjata madwar il-bobina li tqabba u li tkun f'kuntatt tajjeb magħha. Huwa importanti li l-bobina ma titgħaffiġx waqt il-proċess ta' l-ippakkjar minhabba li dan jista' jwassal għal riżultati ħżiena⁽³⁾. Il-plattina ti tinfaqa' titqiegħed f'pothha u l-plagg li jzomm jiġi invitat sewwa. Ir-reċipjent kif hekk imhejji jkun trasferit għal fuq l-istand ta' rfid ta' tqabba, bil-plattina li tinfaqa' fuq in-naħa ta' fuq, u r-reċipjent għandu jkun lokalizzat f'armarju ventilat xieraq jew inkella f'cellula li tqabba. L-għejun ta' l-elettriku jintrabat mat-trufijiet esterni tal-plagg li jqabba u jiġu applikati 10 A. Il-hin minn meta jibda t-tahlit u jinxteghel l-elettriku m'għandux jeċċedi l-10 minuti.

Is-sinjali prodotti mit-*transducer* tal-pressjoni jkun irregistrat fuq sistema xierqa li tippermetti kemm il-valutazzjoni u kif ukoll il-ġenerazzjoni ta' registrazzjoni permanenti tal-profil tal-hin mal-pressjoni (eż. registratur b'kurrent qasir ma' registratur *chart*). It-tahlita tissahhan sakem il-plattina li tinfaqa' tinkiser jew sakemm mill-anqas ikunu għaddew 60 s. Jekk il-plattina li tinfaqa' ma tinkisirx, it-tahlita għandha tithalla tibdred qabel ma, b'galbu kbir, l-apparat jizzarma, billi jittieħdu l-prekawzjonijiet għal xi forza ta' pressjoni li jista' jkun hemm. Għandhom jitwettqu hames provi bis-sustanza tat-test u bis-sustanza(i) tar-referenza. Il-hin meħtieġ sabiex il-pressjoni titla' minn 690 kPa sa 2 070 kPa aktar mill-pressjoni atmosferika għandu jkun innotat. Il-hin taż-żieda medja fil-pressjoni tkun ikkalkulata.

F'ċerti każijiet, is-sustanzi jistgħu jiġġeneraw zieda fil-pressjoni (għolja wisq jew baxxa wisq), minhabba r-reazzjonijiet kimiċi li ma jkunux jikkarakterizzaw il-proprietajiet ossidanti tas-sustanza. F'dawn il-każijiet, jista' jkun hemm il-htieġa li jkun ripetut it-test b'sustanza inerta, eż. diatomit (*kieselguhr*), minflok iċ-ċelluloża, sabiex tkun iċċarata n-natura tar-reazzjoni.

⁽¹⁾ Tahlitiet ta' ossidanti maċ-ċelluloża għandhom jitqiesu bħala potenzjalment esploziv u għandhom jintużaw bil-galbu xieraq.

⁽²⁾ Fil-prattika dan jista' jsir bil-preparament ta' tahlita ta' 1:1 ta' likwidu għat-test u ċelluloża f'ammont akbar milli meħtieġ għat-test u bit-trasferiment ta' 5 ± 0,1 g fir-reċipjent tal-pressjoni. It-tahlita għandha tiġi ppreparata friska għal kull esperiment.

⁽³⁾ B'mod partikolari, il-kuntatt bejn it-tidwiriet ta' hdejn xulxin tal-bobina għandu jiġi evitat.

▼B**2. DATA**

Il-hinijiet taż-żieda fil-pressurem kemm għas-sustanza tat-test u wkoll għas-sustanza(i) ta' referenza. Il-hinijiet taż-żieda fil-pressurem għat-testijiet b'sustanza inerta, jekk imwettqa.

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Il-hinijiet taż-żieda fil-pressurem kemm għas-sustanza tat-test u wkoll għas-sustanza(i) ta' referenza jkunu ikkalkulati.

Il-hinijiet taż-żieda fil-pressurem għat-testijiet b'sustanza inerta, (jekk imwettqa) jkunu ikkalkulati.

Uhud mill-eżempji tar-riżultati huma murija fit-Tabella 1

Tabella 1

Eżempji tar-riżultati ^(a)

Sustanza ^(b)	Il-hin taż-żieda medja fil-pressurem ta' tahlita ta' 1:1 maċ-celluloża (ms)
Dikromat ta' l-ammonju, tahlita saturata fl-ilma	20 800
Nitrat tal-kalċju, tahlita saturata fl-ilma	6 700
Nitrat ferriku, tahlita saturata fl-ilma	4 133
Perklorat tal-litju, tahlita saturata fl-ilma	1 686
Perklorat tal-magnezju, tahlita saturata fl-ilma	777
Nitrat tan-nikil, tahlita saturata fl-ilma	6 250
Aċidu nitriku, 65 %	4 767 ^(c)
Aċidu perkloriku, 50 %	121 ^(c)
Aċidu perkloriku, 55 %	59
Nitrat tal-potassju, 30 % tahlita fl-ilma	26 690
Nitrat tal-fidda, tahlita saturata fl-ilma	— ^(d)
Klorat tas-sodju, 40 % tahlita fl-ilma	2 555 ^(c)
Nitrat tas-sodju, 45 % tahlita fl-ilma	4 133
<i>Sustanza inerta</i>	
Ilma:Ċelluloża	— ^(d)

^(a) ara r-referenza (1) għall-klassifika skond l-iskema tat-trasport tan-NU.

^(b) Is-soluzzjonijiet saturati għandhom jithejjew f'20 °C.

^(c) Valur medju minn esperimenti komparattivi minn laboratorji differenti.

^(d) Il-pressurem massima ta' 2 070 kPa ma ntlahqitx.

▼B**3. RAPPORT****3.1 RAPPORT TAT-TEST**

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

- l-identità, il-kompożizzjoni, il-purità, eċċ. tas-sustanza għat-test;
- il-konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test;
- il-proċedura użata għat-tnixxif taċ-ċelluloża;
- il-kontenut ta' l-ilma użat fiċ-ċelluloża;
- ir-riżultati tal-kejl;
- ir-riżultati mit-testijiet b'sustanza inerta, jekk ikun hemm;
- il-hinijiet medji taż-żieda fil-pressure kkalculati;
- xi devjazzjonijiet minn dan il-metodu u r-raġunijiet ta' dawn;
- l-informazzjoni addizzjonali kollha, jew ir-rimarki, dwar l-interpretazzjoni tar-riżultati;

3.2 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI ⁽¹⁾

Ir-riżultati tat-test huma vvalutati fuq il-bażi ta':

- a) jekk it-tahlita tas-sustanza għat-test u ċ-ċelluloża jaqbdex b'mod spontanju; u
- b) il-paragun fil-hin medju mehtieg sabiex il-pressure titla' minn 690 kPa għal 2 070 kPa, mas-sustanza(i) ta' referenza.

Sustanza likwida għandha titqies ossidanti, meta:

- a) tahlita 1:1, fil-piż, tas-sustanza u ċ-ċelluloża taqbad b'mod spontanju; jew
- b) tahlita 1:1, fil-piż, tas-sustanza u ċ-ċelluloża turi zieda fil-hin tal-medja tal-pressure li tkun anqas minn jew ugwali għal, zieda fil-hin għal tahlita 1:1 fil-piż, ta' 65 % (w/w) aċidu nitriku fl-ilma u ċelluloża.

Sabiex ikunu evitati riżultati pożittivi foloz, ir-riżultati mogħtija meta tiġi ttestjata s-sustanza għat-test ma' materjal inert, għandhom jitqiesu wkoll fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

⁽¹⁾ Ara r-referenza 1 għall-interpretazzjoni tar-riżultati skond ir-regolamenti għat-trasport tan-NU bl-użu ta' bosta sustanzi ta' referenza.

▼B

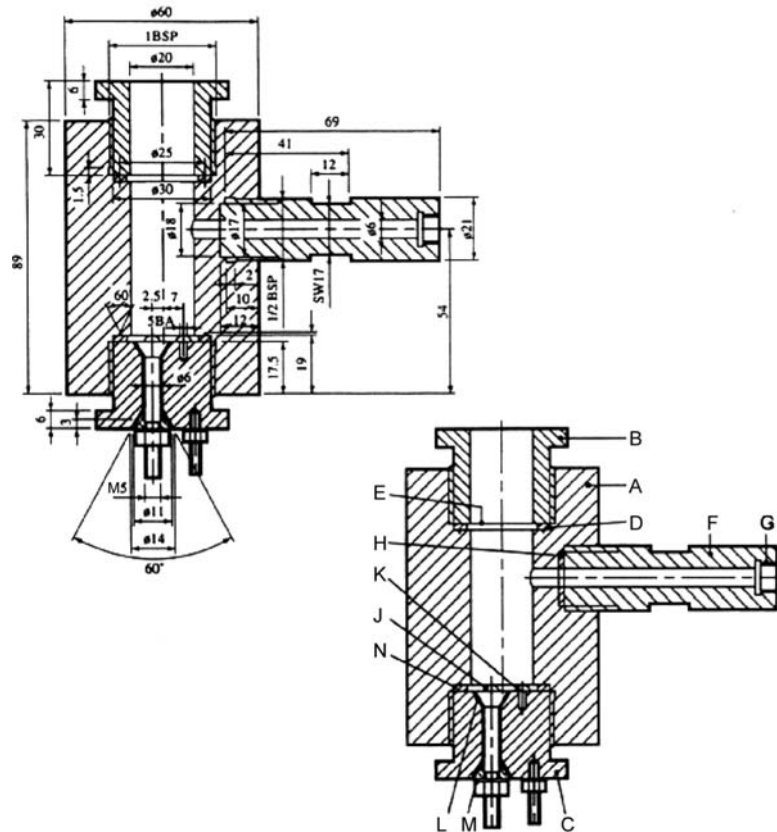
4.

REFERENZI

- (1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. It-tielet edizzjoni riveduta. Pubblikazzjoni tal-NU, Nru.: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, paġna 342. Test O.2: Test għall-likwidu ossidanti

Figura 1

Reċipjent tal-Pressjoni



(A) Il-qafas tar-reċipjent tal-pressjoni	(B) Il-plagg li jżomm id-disk li jinfaka'	(C) Il-plagg li jqabba
(D) Washer minn ċomb artab	(E) Id-disk li jinfaka'	(F) Id-driegħ tal-ġenb
(G) Ir-ras tat-transducer tal-pressjoni	(H) Il-washer	(J) L-elettrodu bl-in-sulazzjoni
(K) L-elettrodu ma' l-earth	(L) L-insulazzjoni	(M) Il-kona ta' l-azzar
(N) Il-kanal li jobronn il-washer		

▼ B

Figura 2
Stend għall-irfid

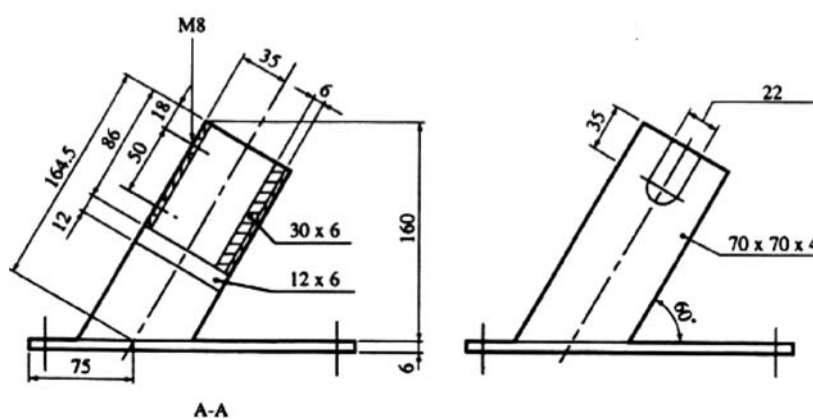
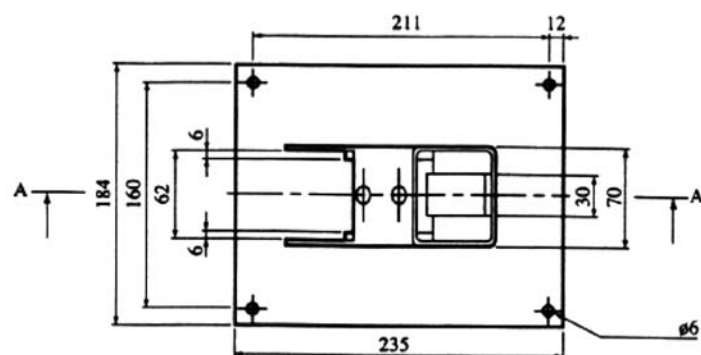


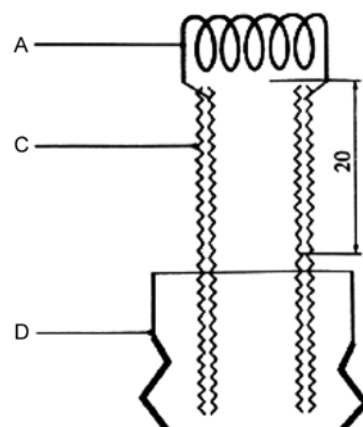
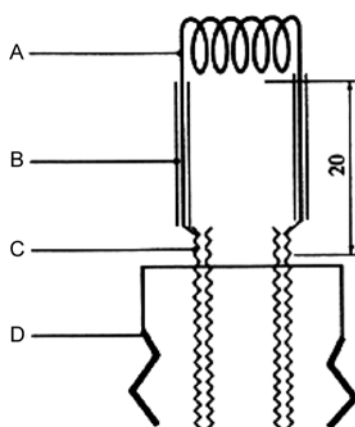
Figura 3
Sistema li tqabbad

(A) Bobina li
tqabbad

(B) Insulazzjoni

(C) Elettrodi

(D) Plagg li
jqabbad



Nota: tista' tintuża kwalunkwe konfigurazzjoni minn dawn.

▼ **M1****A.22. ID-DIJAMETRU MEDJU ĠEOMETRIKU TAL-FIBRI PEŻAT SKONT IT-TUL TAGHHOM****1. IL-METODU****1.1. DAHLA**

Dan il-metodu jiddeskrivi proċedura li tkejjel id-Dijametru Medju Geometriku Peżat Skont it-Tul [Length Weighted Geometric Mean Diameter] (LWGMD) ta' massa ta' Fibri Minerali Maghmula mill-Bniedem [Man Made Minerla Fibres] (MMMF). Minhabba li l-LWGMD tal-popolazzjoni se jkollha probabbiltà ta' 95 % li tkun bejn il-livelli ta' kunfidenza ta' 95 % ($LWGMD \pm$ żewġ devjazzjonijiet standard) tal-kampjun, il-valur irrapportat (il-valur tat-test) se jkun l-inqas limitu ta' kunfidenza ta' 95 % tal-kampjun (iġifieri $LWGMD - 2$ devjazzjonijiet standard). Il-metodu huwa bbażat fuq aġġornament (Gunju 1994) ta' abbozz ta' proċedura industrijali HSE maqbula fil-laqgħa bejn l-ECFIA u l-HSE f'Chester fis-26/9/93 u żviluppat għal u permezz ta' tieni prova interlaboratorja (1, 2). Dan il-metodu ta' kejl jista' jintuza sabiex jikkarakterizza d-dijametru tal-fibra ta' sustanzi tal-massa jew prodotti li fihom l-MMMFs u jinkludu fibri ta' ċeramika refrattarja (RCF), fibri tal-ħġieġ maghmula mill-bniedem (MMVF), u fibri tal-kristallina u l-polikristallina.

L-ippeżar tat-tul huwa mod ta' kumpens għall-effett fuq id-distribuzzjoni tad-dijametru kkawżata bit-tkissir ta' fibri twal meta jkunu qed isiru l-kampjuni jew jitmiss il-materjal. Tintuza statistika ġeometrika (medja ġeometrika) sabiex tkejjel id-distribuzzjoni tad-daqs tad-dijametri tal-MMMF għaliex ġeneralment dawn id-dijametri jkollhom distribuzzjonijiet tad-daqs li jqarbu n-norma logaritmika.

Il-kejl tat-tul kif ukoll tad-dijametru huwa tedjanti u jiehu hafna ħin imma, jekk jitkejlu biss daww il-fibri li jmissu linja infinitament irqieqa fuq il-firxa viżiva ta' SEM, imbagħad il-probabbiltà li tingħazel wahda mill-fibri tkun proporzjonali għat-tul tagħha. Minhabba li b'hekk jitqies it-tul fil-kalkoli tal-ippeżar tat-tul, l-uniku kejl meħtieġ huwa d-dijametru u l-LWGMD-2SE jista' jkun ikkalkulat kif deskritt.

1.2. TIFSIRIET

Il-partikula: Ogġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' ta' inqas minn 3:1.

Il-fibra: Ogġett li għandu proporzjon bejn it-tul u l-wisa' (aspect ratio) mill-inqas 3:1.

1.3. AMBITU U LIMITAZZJONIJET

Il-metodu huwa ddisinjat sabiex janalizza d-distribuzzjoni ta' dijametri li jkollhom valur medja bejn 0,5 μm u 6 μm . Dijametri ikbar jistgħu jitkejlu bl-użu ta' ingrandimenti minn SEM iktar baxxi iżda l-metodu se jkun dejjem iktar limitat fid-distribuzzjonijiet tal-fibra iktar fini u jekk id-dijametru medjan ikun inqas minn 0,5 μm , huwa rrakkomandat kejl permezz ta' TEM (transmission electron microscope).

▼ **M1**

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

Numru ta' kampjuni rappreżentattivi tal-qalba jittiehdu mill-kutra tal-fibra jew jiġu mislutin mill-massa tal-fibra. Il-fibri tal-massa jitqassru bl-użu ta' proċedura tat-tifrik u sottokampjun rappreżentattiv mxerred fl-ilma. Il-biċċiet jiġu estratti u ffiltrati minn filtru tal-polikarbonat b'pori tad-daqs 0,2 µm u jiġu ppreparati għal analizi bl-użu ta' tekniki tal-iscanning electron microscope (SEM). Id-dijametri tal-fibri jitkejlu taht ingrandiment tal-iskrin ta' $\times 10\,000$ jew ikbar⁽¹⁾ bl-użu ta' metodu ta' interċetazzjoni tal-linja sabiex tittiehed stima imparzjali tad-dijametru medjan. L-inqas intervall tal-kunfidenza ta' 95 % (ibbazat fuq test unilaterali) jiġi kkalkulat sabiex issir stima tal-izjed valur baxx tal-medju ġeometriku tad-dijametru tal-fibra tal-materjal.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-ITTESTJAR

1.5.1. **Il-prekawżjonijiet / is-sikurezza**

L-espożizzjoni tal-persuni għall-fibri fl-arja għandha tkun imminimizata u għandha tintuża vetrina li tkun mghammra b'ventilatur għall-estrazzjoni jew kaxxa mghammra bl-ingwanti sabiex isir kuntatt mal-fibri niexfa. Għandu jitwettaq monitoraġġ preiodiku tal-espożizzjoni tal-persuna sabiex tiġi determinata l-effikaċja tal-metodi ta' kontroll. Meta jisir kuntatt mal-MMMFs għandhom jintlibsu l-ingwanti li jintremew sabiex tonqos l-irritazzjoni tal-ġilda u tkun evitata l-kontaminazzjoni min-naha għall-ohra.

1.5.2. **L-apparat / it-tagħmir**

- Pressa u dadi tal-mastri (b'kapaċità li jipproduċu 10 MPa).
- filtri kapillari tal-polikarbonat bid-daqs tal-pori ta' 0,2 µm (dijametru ta' 25 mm).
- filtru ta' membrana tal-ester taċ-ċelluloża bid-daqs tal-pori ta' 5 µm sabiex jintuża bħala filtru tal-appoġġ.
- Apparat tal-ħġieġ għall-filtrazzjoni (jew sistemi tal-filtrazzjoni li jintremew) li jiehu filtri li għandhom dijametru ta' 25 mm (eż. Millipore glass microanalysis kit, tat-tip nru XX10 025 00).
- Ilma li jkun għadu kemm ġie ddistallat, iffiltrat minn filtru bid-daqs tal-pori ta' 0,2 µm sabiex jitnehhew il-mikro-organizmi.
- Pulverizzatur li jkopri d-deheb jew deheb u palladju.
- Scanning electron microscope li kapaċi jirrisolvi sa' 10 nm u jkabbar b'10 000.
- Mixxellanti: spatuli, xafra tal-iskarpell tat-tip 24, pinzetta, tubi tas-SEM, kolla tal-karbonju jew tejp adeziv tal-karbonju, irbaba tal-fidda.
- Sonda ultrasonika jew banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank
- Core sampler jew cork borer, sabiex jiehu l-kampjuni tal-qalba mill-kutra tal-MMMF

⁽¹⁾ Dan il-valur ta' ingrandiment huwa indikat għall-fibri tad-daqs 3 µm, għall-fibri tad-daqs 6 µm ingrandiment ta' $\times 5\,000$ jaf ikun aħjar.

▼ **M1**1.5.3. **Il-Proċedura tat-test**1.5.3.1. *It-teħid tal-kampjuni*

Jintuża core sampler ta' 25 mm jew cork borer sabiex jittieħdu kampjuni tal-profil trasversali. Dawn għandhom ikunu spazjati b'mod ekwu matul il-wisa' ta' tul qasir tal-kutra jew meħuda minn partijiet sporadiċi jekk ikun hemm biċċiet twal tal-kutra disponibbli. L-istess tagħmir jista' jintuża sabiex jiġu estratti kampjuni sporadiċi minn fibri mahlula. Meta huwa possibbli għandhom jittieħdu sitt kampjuni, sabiex jirriflettu l-varjazzjonijiet tal-ispazju fil-materjal tal-massa.

Is-sitt kampjuni tal-qalba għandhom jifarku b'dada li jkollha dijametru ta' 50 mm b'10 Mpa. Il-materjal jithallat bi spatula u jerga jiġi ppressat b'10 Mpa. Il-materjal imbagħad jitneħħa mid-dada u jinħażen fi flixkun tal-ħġieġ issigillat.

1.5.3.2. *Il-Preparazzjoni tal-Kampjun*

Fejn jeħtieġ, tista' titneħħa il-kopertura organika li taqqad billi l-fibra titqiegħed go forn b'temperatura ta' 450 grad C għal madwar siegħa.

Sabiex ikun sottodiviz il-kampjun għandu jinqasam f'kon u fi kwarti (dan għandu jsir ġewwa vetrina tat-trab).

Bl-użu ta' spatula, zid ammont żgħir ($< 0,5$ g) tal-kampjun ma' 100 ml ilma li jkun għadu kemm ġie ddistillat u ffiltrat minn go filtru b'membrana ta' $0,2 \mu\text{m}$ (sorsi alternattivi ta' ilma purissimu jistgħu jintużaw, jekk jirriżulta li huma xierqa). Hallat sew bl-użu ta' sonda ultrasonika li topera b'saħħa ta' 100 W u intunata sabiex tiffurma ħofra fl-istruttura. (Jekk ma tkunx disponibbli sonda uża l-metodu li ġej: ċaqraq l'hemm u l'hawn u dawwar repetittivament għal madwar 30 sekonda; qiegħdu f'banju ultrasoniku li joqgħod fuq bank għal madwar hames minuti; imbagħad ċaqraq l'hemm u l'hawn u dawwru repetittivament għal madwar 30 sekonda ohra).

Eżatt wara t-tixrid tal-fibra, neħhi numru ta' alikwoto (eż. tliet alikwoti ta' 3, 6 u 10 ml) bl-użu ta' pipetta bl-ghonq wiesa (li tesa' 2-5 ml).

Iffiltra f'vakum kull alikwota b'filtru tal-polikarbonat ta' $0,2 \mu\text{m}$ appoġġat b'filtru tal-appoġġ li għandu pora MEC ta' $5 \mu\text{m}$, bl-użu ta' lenbut tal-filtrazzjoni tal-ħġieġ ta' 25 mm li jkollu depożitu tal-likwidu ċilindriku. Fil-lenbut għandhom jitqiegħdu madwar 5 ml ta' ilma distillat iffiltrat u l-alikwot titqiegħed bil-mod fl-ilma bl-użu tal-pipetta fejn il-ponta tagħha tinzamm taħt il-menisku. Il-pipetta u d-depożitu tal-likwidu iridu jiġu mlaħalha sew wara dan il-proċess bil-pipetta, għaliex il-fibri irraq għandhom tendenza li jkunu iżjed fil-wieċ.

B'attenzjoni neħhi l-filtru u sseparah mill-filtru tal-appoġġ qabel ma' tqiegħdu f'kontenitur biex jinxef.

▼ **M1**

Aqta sezzjoni daqs ta' kwart jew nofs tad-depożitu ffiltrat b'xafra tal-iskarpell tat-tip 24 b'moviment 'l hinn u 'l hawn tal-id. B'attenzjoni wahhal is-sezzjoni maqtuha ma' trej tas-SEM permezz ta' tejp tal-karbonju jew kolla tal-karbonju. Għandhom jiġu applikati l-irbaba tal-fidda f'tal-inqas tliet pozzizzjonijiet sabiex jittejjeb il-kuntatt elettriku fit-truf tal-filtru u tat-trej. Meta l-kolla / l-irbaba tal-fidda tinxfef/jinxfu, bil-pulverizzatur aghmel kopertura ta' madwar 50 nm ta' deheb jew deheb u palladju fuq il-wieċ tad-depożitu.

1.5.3.3. *Il-kalibrar tas-SEM u l-operat*1.5.3.3.1. *Il-kalibrar*

Il-kalibrar tas-SEM għandu jkun ikkontrollat tal-inqas darba fil-gimgha (idealment darba kuljum) bl-użu ta' xibka tal-kalibrazzjoni ċċertifikata. Il-kalibrar għandu jkun ikkontrollat skont standard iċċertifikat u jekk il-valur mkejjel (SEM) ma jkunx f'medda ta' $\pm 2\%$ tal-valur iċċertifikat, il-kalibrar tas-SEM irid ikun agġustat u jerga jkun ikkontrollat.

Is-SEM irid ikun kapaċi jirrisolvi tal-inqas dijametru b'vizibbiltà minima ta' 0,2 μm , bl-użu ta' matriċi ta' kampjun reali, b'ingrandiment ta' $\times 2\,000$.

1.5.3.3.2. *L-operat*

Is-SEM għandu jkun operat fuq ingrandiment ta' 10 000 ⁽¹⁾ bl-użu ta' kundizzjonijiet li jagħtu reżoluzzjoni tajba b'immagini aċċetabbli b'rati baxxi ta' skan bħal, per eżempju, 5 sekondi għal kull ritratt. Għalkemm il-htigijiet tal-operat ta' SEMs differenti jistgħu ivarjaw, ġeneralment sabiex tinkiseb l-aħjar vizibbiltà u reżoluzzjoni, b'materjali li relattivament għandhom daqs atomiku żgħir, għandhom jintużaw vultaġġi ta' aċċelerazzjoni ta' bejn 5-10 keV issetjati fuq tikka ta' daqs żgħir u distanza tax-xogħol qasira. Meta jkun qiegħed isir it-travers lineari, għandha tintuża inklinazzjoni ta' 0° sabiex ikun minimizzat il-bżonn li terġa tiffoka jew, jekk is-SEM għandu stage ewċentrika, għandha tintuża l-istage ewċentrika Jista' jintuża ingrandiment iktar baxx jekk il-materjal m'għandux fibri (b'dijametru) żgħar u d-dijametru tal-fibri huma kbar ($> 5\ \mu\text{m}$)

1.5.3.4. *Il-kejl tad-daqs*1.5.3.4.1. *Eżami taħt ingrandiment baxx sabiex ikun ivvalutat l-kampjun*

Fil-bidu l-kampjun għandu jiġi eżaminat taħt ingrandiment baxx sabiex isir tfittix għal evidenza ta' tagħqid ta' fibri kbar u sabiex issir valutazzjoni tad-densità tal-fibri. Fil-każ ta' wisq għoqod huwa rrakomandat li jiġi ppreparat kampjun gdid.

Huwa meħtieġ li jitkejjel numru minimu ta' fibri għall-korettezza fl-istatistika u d-densità għolja tal-fibri taf tkun mixtieqa għaliex l-eżaminazzjoni tal-partijiet vojta tiehu hafna hin u ma tagħtix kontribut għall-analiżi. Madankollu, jekk il-filtru ikun mimli wisq, isir diffiċli biex jitkejlu l-fibri kollha li jistgħu jiġu mkejla u, peress li li l-fibri ż-żgħar jistgħu jinħbew wara ohrajn li huma ikbar, tista' ma tindunax bihom.

⁽¹⁾ Għall-fibri tad-daqs 3 μm , ara n-nota ta' qabel.

▼ **M1**

Il-parzjalità lejn stima eċċessiva tal-LWGMD tista' tirriżulta minn fibri li għandhom densità ta' iktar minn 150 fibra f'kull millimetru tal-linja traversa. Minn naha l-oħra, il-konċentrazzjonijiet tal-fibra baxxi jżidu l-hin tal-analiżi u, spiss, finanzjarjament ikun jaqbel li jiġi ppreparat kampjun b'densità tal-fibra iżjed viċin l-ottimu milli tkompli bl-ghadd ta' filtri li għandhom konċentrazzjoni baxxa. L-aħjar densità tal-fibra għandha tagħti medju ta' madwar fibra wahda jew tnejn f'kull firxa viżiva taht ingrandiment ta' x 5 000. Minkejja dan, l-aħjar densità tiddependi fuq id-daqs (dijametru) tal-fibri, għalhekk jeħtieġ li l-operatur juża xi ġudizzju espert sabiex jiddeċidi jekk id-densità tal-fibra hijiex ottima jew le.

1.5.3.4.2. L-ippeżar skont it-tul tad-dijametru tal-fibri

Jingħaddu biss dawk il-fibri li jmissu (jew jaqsmu) linja (infinitament) rqiqha mpingija fuq l-iskrin tas-SEM. Għal din ir-raġuni titpinga linja orizzontali (jew vertikali) fiċ-ċentru tal-iskrin.

Alternattivament jitqiegħed punt uniku fiċ-ċentru tal-iskrin u jiġi inizjat skan kontinwu f'direzzjoni wahda matul il-filtru. Kull fibra li għandha aspect ratio ikbar minn 3:1 li tmiss jew taqsam dan il-punt ikollha d-dijametru mkejje l u rreġistrat.

1.5.3.4.3. Il-kejl tad-daqs tal-fibra

Huwa rrakkomandat li jiġu mkejla minimu ta' 300 fibra. Kull fibra tiġi mkejla darba biss fil-punt tal-intersezzjoni mal-linja jew il-punt impingi fuq l-immagini (jew viċin tal-punt tal-intersezzjoni jekk it-truf tal-fibri huma moħbija). Jekk tiltaqa' ma' fibri li għandhom profil sezzjonali mhux uniformi, għandu jintuża kejl li jirrapreżenta l-medju tad-dijametru tal-fibra. Għandha tingħata attenzjoni għal kif jiġi definit it-tarf u kif tiġi mkejla l-iqsar distanza bejn it-truf tal-fibra. Il-kejl tad-daqs jista' jsir on-line, jew off-line fuq immagini jew ritratti maħżuna. Huma rrakkomandati sistemi semi awtomatiċi li jkejlu l-immagini li jniżżlu d-dejta direttament fuq spreadsheet, għaliex inaqqsu t-telf ta' hin, jeliminaw l-iżbalji tat-traskrizzjoni u l-kalkoli jistgħu jiġu awtomatizzati.

It-truf tal-fibri twal għadhom ikunu kkontrollati taht ingrandiment baxx sabiex tiżgura li mhux qed jinbarmu lura gol-firxa viżiva u qed jiġu mkejla darba biss.

2. ID-DEJTA

2.1. IT-TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Normalment, iddijametru tal-fibri ma jkollhomx distribuzzjoni normali. Madankollu, permezz ta' trasformazzjoni logaritmika jkun possibbli li tikseb distribuzzjoni li toqrob aktar lejn in-normal.

Ikkalkula l-medju aritmetiku (medju lnD) u d-devjazzjoni standard ($SD_{\ln D}$) tal-logaritmu ta' valuri tal-bażi e (lnD) tad-dijametri (D) ta' n fibri..

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

▼ M1

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{mean } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Iddividi d-devjazzjoni standard bir-radiċi kwadrata tan-numru (n) ta' kejl differenti sabiex tikseb id-devjazzjoni standard ($SE_{\ln D}$).

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Naqqas għal darbtejn il-valur tad-devjazzjoni standard mill-medju u kkalkula l-esponenzjali ta' dan il-valur (il-medju bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard) sabiex tohroġ il-medju ġeometriku bit-tnaqqis ta' żewġ devjazzjonijiet standard ġeometriċi.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } \ln D - 2SE_{\ln D})} \quad (4)$$

3. **IR-RAPPURTAĠĠ**

IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas it-tagħrif li ġej:

- Il-valur tal-LWGMD-2SE.
- Kwalunkwe devjazzjoni u b'mod partikolari dawk li jista' jkollhom effett fuq il-preċiżjoni jew il-korrettezza tar-riżultati bil-ġustifikazzjonijiet xierqa.

4. **IR-REFERENZI**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.
2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼ **M4****A.23 KOEFFIĊJENT TAL-PARTIZZJONI (1-Ottanol/Ilma): METODU TA' THAWWID BIL-MOD****DAHLA**

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' thawwid bil-mod (1). Għalhekk dan huwa approċċ sperimentali adattat għad-determinazzjoni diretta ta' P_{OW} ta' sustanzi idrofobiċi hafna.
2. Metodi ohra għad-determinazzjoni tal-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma (P_{OW}) huma l-metodu ta' "thawwid tal-flixxun" (2), u d-determinazzjoni tal- P_{OW} minn mgħiba ta' ritenzjoni ta' HPLC ta' fażi inversa (3). Il-metodu ta' "thawwid tal-flixxun" għandu tendenza għal oġġetti estraneji (artifacts) minhabba t-trasferiment ta' taqtiriet mikro ta' ottanol fil-faži fl-ilma. B'valuri jiżdiedu tal- P_{OW} il-preżenza ta' dawn it-taqtiriet fil-faži fl-ilma twassal għal stima eċċessiva dejjem tiżdied tal-koncentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fl-ilma. Għalhekk, l-użu tiegħu huwa limitat għal sustanzi b' $\log P_{OW} < 4$. It-tieni metodu joqghod fuq dejta solida ta' valuri P_{OW} iddeterminati direttament biex jikkalibraw ir-relazzjoni bejn mgħiba 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 invalidata 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 inertti nstabu relazzjonijiet sinifikanti hafna 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 korrelat mat-tossicità 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 ohra 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' jġri mill-kimiċi fl-ambjent.

Kamp ta' applikazzjoni

6. L-esperiment ta' thawwid bil-mod jitqies li jnaqqas il-formazzjoni ta' taqtiriet mikro minn taqtiriet ta' 1-ottanol fil-faži tal-ilma. Bħala konsegwenza, ma jkunx hemm stima eċċessiva ta' koncentrazzjoni fl-ilma minhabba molekuli ta' sustanza għall-ittestjar assoċjati ma' taqtiriet bħal dawn. Għalhekk il-metodu ta' thawwid bil-mod huwa partikolarment adattat għad-determinazzjoni ta' P_{OW} għal sustanzi b'valuri mistennija ta' $\log P_{OW}$ ta' 5 u oghla, li għalihom il-metodu ta' thawwid tal-flixxun (2) ikollu tendenza li jrendi riżultati żbaljati.

▼ **M4**

DEFINIZZJONI U UNITAJIET

7. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' sustanza bejn ilma u solvent lipofiliku (1-ottanol) jikkarakterizza d-distribuzzjoni tal-ekwilibriju tal-kimika bejn iż-żewġ fażijiet. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni bejn l-ilma u l-ottanol (P_{OW}) huwa definit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjonijiet ta' ekwilibriju tas-sustanza għall-ittestjar f' l-ottanol issaturat bl-ilma (C_O) u ilma ssaturat b' l-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, l-ottanol u s-sustanza għall-ittestjar ikunu ekwilibriati 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' taqiriet mikro matul l-esperiment ta' thawwid tal-flixxun jistgħu jitnaqqsu fl-esperiment ta' thawwid bil-mod propost hawn. Fl-esperiment ta' thawwid bil-mod, l-ilma, l-ottanol u s-sustanza għall-ittestjar ikunu ekwilibriati f' reattur li jhawwad b' 'termostat miegħu. L-iskambju bejn il-fażijiet ikun aċċellerat bit-thawwid. It-thawwid jintroduċi turbulenza limitata li ssahħa l-iskambju bejn l-ottanol u l-ilma mingħajr ma jkunu ffurmati taqiriet mikro (1).

APPLIKABILITÀ TAT-TEST

10. Minhabba 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' l-ottanol/ilma.
11. Dan il-metodu japplika għal sustanzi puri li ma jiddisassoċjawx jew li jassoċjaw u li ma jurux attività interfaccjali sinifikanti. Jista' jkun applikat biex ikun iddeterminat il-proporzjon ta' partizzjoni ta' l-ottanol/ilma għal sustanzi u tahlitiet bħal dawn. Meta l-metodu jintuża għal tahlitiet, il-proporzjonijiet ta' partizzjoni ta' l-ottanol/ilma determinati jkunu kondizzjonali u dipendenti mill-kompożizzjoni kimika tat-tahlita ttestjata u mill-kompożizzjoni elettrolitika uzata bħala fażi fl-ilma. Jekk jittiehdu passi addizzjonali, il-metodu jkun applikabbli wkoll għal komposti li jiddisassoċjaw jew li jassoċjaw (il-paragrafu 12).
12. Minhabba ekwilibriji multipli fl-ilma u f' l-ottanol involuti fil-partizzjoni ta' l-ottanol/ilma ta' sustanzi li jiddisassoċjaw bħall-aċidi organiċi u l-fenoli, bażijiet organiċi u sustanzi organometalliċi, il-proporzjon ta' partizzjoni l-ottanol/ilma huwa kostant kondizzjonali dipendenti hafna mill-kompożizzjoni elettrolitika (7)(8). Id-determinazzjoni tal-proporzjon ta' partizzjoni l-ottanol/ilma, għalhekk, tehtieg 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 mehtieg 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-sahha jonika għandha tkun identika fl-esperimenti kollha billi jintuża elettrolit bħala sfond.

▼ M4

13. Jistgħu jinqalgħu diffikultajiet fit-test meta jsir it-test għal sustanzi b'solubilità fl-ilma baxxa jew b' P_{OW} għoli minhabba l-fatt li l-konċentrazzjonijiet fl-ilma jsiru baxxi hafna 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. Reagenti kimiċi għandhom ikunu ta' grad analitiku jew ta' purezza oghla. 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 haġja 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' thawwid 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 l-ottanol;
- (c) kostant(i) ta' disassoċjazzjoni ta' sustanzi jonizzabbli (Linja Gwida 112 tal-OECD (9));
- (d) solubilità fl-ilma (10);
- (e) idrolizi 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 hawwadin manjetiċi u vireg manjetiċi li jhawdu 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-thawwid 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 geometrija akbar minn ta' litru wiehed, biex ikun jista' jinkiseb volum suffiċjenti ta' ilma għall-estrazzjoni u l-analiżi ta' kimika. Dan se jirrizulta f'konċentrazzjonijiet oghla 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 ipprezentat minn Pinsuwan et al. (14):

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

▼ M4

fejn

$$SR = S_{\text{oct}}/S_w \text{ (fil-molarità);}$$

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-idrofobicità 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-thawwid 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' thawwid bil-mod.

18. Ir-reċipjenti għandhom ikunu magħmulin minn materjal inert b'mod li l-assorbiment mill-uċuħ tar-reċipjenti jkun negligibbli.

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'estraxxjoni bl-aċidu, bazi 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 jinhema għal mill-anqas tliet sigħat f'400 °C.
20. Iz-żewġ solventi jkunu ssaturati reċiprokament qabel l-esperiment billi jkunu ekwilibrat f'reċipjent kbir bizzejjed. Dan isir billi s-sistema f'żewġ fażijiet titthawwad bil-mod għal jumejn.
21. Tintgħażel konċentrazzjoni adattata ta' sustanza għall-ittestjar u tinhall f'1-ottanol (saturat bl-ilma). Il-koeffiċjent tal-partizzjoni ta' 1-ottanol/ilma jkun jehtieglu 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 sospiza.
22. L-ammont adattat ta' sustanza għall-ittestjar jinhall f'1-ottanol (saturat bl-ilma). Jekk l-istima ta' log P_{OW} tkun aktar minn hamsa, għandha tingħata attenzjoni biex is-soluzzjonijiet ta' 1-ottanol użati għall-esperiment ikunu mingħajr sustanza għall-ittestjar solida sospiza. Għal dak il-ghan, qed tiġi segwita l-proċedura li ġejja għall-kimiċi b'valur stmat ta' log $P_{OW} > 5$:

— is-sustanza għall-ittestjar tinhall f'1-ottanol (saturat bl-ilma);

▼ M4

- is-soluzzjoni tinghata hin biżżejjed biex is-sustanza solida sospiża toqghod. Waqt li s-sustanza tkun qed toqghod, 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 tittejjel. Jekk il-konċentrazzjoni mkejla tkun konsistenti mad-dilwizzjoni, is-soluzzjoni stokk dilwita tkun tista' tintuża fl-esperiment ta' thawwid 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 jehtigilhom jiġu stabbiliti qabel l-esperiment f'dawk il-każijiet li għalihom ikunu mehtieġa metodi ta' estrazzjoni. Is-sinjal analitiku jkun jehtieġu jiġi kkoreġut għal in bjanki u għandha tinghata attenzjoni biex ma jsehhux riporti ta' analita minn kampjun għal ieħor.
24. L-estraxxjoni tal-fażi tal-ilma b'solvent organiku u konċentrazzjoni minn qabel tal-estratt aktarx li jkunu mehtieġa qabel l-analiżi, minhabba konċentrazzjonijiet pjuttost baxxi ta' sustanzi għall-ittestjar idrofobiċi fil-fażi tal-ilma. Għall-istess raġuni jkun mehtieġ li jitnaqqsu l-konċentrazzjonijiet in bjank eventwali. Għal dak il-ghan, ikun mehtieġ li jintużaw solventi ta' purezza għolja, preferibbilment solventi għall-analiżi tar-residwi. Minbarra dan, li wiehed jahdem b'ogġetti tal-ħgieġ mahsul in sew minn qabel (eż. hasil b'solventi jew ħami f'temperatura għolja) jghin biex tkun evitata l-kontaminazzjoni kroċjata.
25. Stima tal-log P_{OW} tista' tinkiseb minn programm ta' stima jew permezz ta' ġudizzju esperti. Jekk il-valur ikun oghla minn sitta, f'dak il-każ korrezzjonijiet in bjank u r-riporti analita jehtieġu 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 obligatorju, biex ikunu jistgħu jintlaħqu fatturi ta' konċentrazzjoni minn qabel. Huma kummerċjalment disponibbli għadd ta' programmi tas-software għall-istima tal-log P_{OW} ⁽¹⁾, eż. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) u ACD log P (19). Id-deskrizzjonijiet tal-approċċi tal-stima jinsabu fir-referenzi (20-22).
26. Il-limiti ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għad-determinazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f' 1-ottanol u l-ilma huma stabbiliti bl-użu ta' metodi aċċettati. Bħala regola bazika, il-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni jista' jkun iddeterminat bħala l-konċentrazzjoni fl-ilma jew f' 1-ottanol li tipproduċi proporzjon ta' sinjal għal hoss 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 mehtieġ malli jkun hemm determinazzjoni analitika.

⁽¹⁾ Din l-informazzjoni tinghata biss għall-konvenjenza ta' min jużahom. Programmi ohra ekwivalenti tal-kompjuter jistgħu jintużaw jekk ikun jista' jintwera li jipproduċu l-istess riżultati.

▼ M4

27. Abbazi tal-parametri tal-metodu analitiku u tal-konċentrazzjonijiet mistennija, jiġi ddeterminat daqs approssimattiv tal-kampjun mehtieg 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 mehtiega ($n = 5$). 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 issehh b'paragun mal-kurvi ta' kalibrizzjoni 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} oghla minn sitta, għandu jithallat standard sostitut mal-ilma qabel l-estrazzjoni sabiex ikun irreġistrat it-telf li jsehh 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 hafna ta', jew identiċi għal dawk tas-sustanza għall-ittestjar. Preferibbilment, għal dan il-ghan jintużaw analogi b'tikketti isotopiċi (stabli) tas-sustanzi ta' interess (pereżempju, perdewterat jew b'tikketti ^{13}C). Jekk l-użu ta' isotopi stabli b'tikketta, jiġifieri ^{13}C jew ^2H , ma jkunx possibbli, għandu jintwera minn dejta affidabbli fil-letteratura li l-proprjetajiet fizikokimiċi tas-sostitut huma qrib hafna ta' dawk tas-sustanza għall-ittestjar. Matul l-estrazzjoni ta' likwidu-likwidu tal-fażi tal-ilma jistgħu jiffurmaw l-emulsjonijiet. Dawn jistgħu jitnaqqsu billi jidied il-melh u l-emulsjoni tithalla toqghod matul il-lejl. Il-metodi użati għall-estrazzjoni u għall-konċentrazzjoni minn qabel tal-kampjuni jehtigilhom ikunu rrapportati.
30. Il-kampjuni meħudin mill-fażi ta' l-ottanol jistgħu, jekk ikun mehtieg, 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 jehtigilhom ikunu rrapportati. Dan jinkludi l-metodu tal-estrazzjoni, il-konċentrazzjoni minn qabel u fatturi ta' dilwizzjoni, parametri ta' strumenti, rutina ta' kalibrizzjoni, firxa ta' kalibrizzjoni, irkupru analitiku tas-sustanza għall-ittestjar mill-ilma, zieda 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' l-ottanol/ilma

32. Fl-għażla tal-volumi ta' ilma u l-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 ttiehdu l-kampjuni f'1-ottanol u l-ilma, u l-konċentrazzjonijiet mistennija. Għal raġunijiet ta' sperimentazzjoni, il-volum ta' l-ottanol fis-sistema ta' thawwid bil-mod għandha tintgħazel b'mod li s-saff ta' l-ottanol ikun ohxon biżżejjed ($> 0,5$ cm) sabiex jippermetti t-tehd ta' kampjuni tal-fażi ta' l-ottanol mingħajr ma jiddisturbah.
33. Il-proporzjonijiet tipiċi tal-fażijiet għad-determinazzjonijiet ta' komposti b'log P_{OW} ta' 4,5 u oghla huma 20 sa 50 ml ta' l-ottanol u 950 sa 980 ml ta' ilma f'reċipjent ta' litru wiehed.

▼ **M4***Kundizzjonijiet tat-test*

34. Matul it-test ir-reċipjent tar-reazzjoni għandu termostat biex inaqqas il-varjazzjoni tat-temperatura għal inqas minn 1 °C. L-analiżi għandha titwettaq f'25 °C.
35. Is-sistema sperimentali għandha tkun protetta mid-dawl naturali billi l-esperiment isir f'kamra mudlama jew billi r-reċipjent ta' reazzjoni jitgħatta b'folja tal-aluminju.
36. L-esperiment għandu jsir f'ambjent hieles (kemm jista' jkun) mit-trab.
37. Is-sistema ta' 1-ottanol-ilma tithawwad sakemm jinkiseb ekwilibriju. F'esperiment pilota jkun iwwalut it-tul tal-perjodu ta' ekwilibrazzjoni billi jsir esperiment ta' thawwid bil-mod u perjodikament jittiehed kampjun tal-ilma u ta' 1-ottanol. Il-punti ta' hin ta' tehid ta' kampjun għandhom jitqassmu f'perjodu minimu ta' hames sigħat.
38. Kull determinazzjoni tal- P_{OW} għandha ssir billi jsiru mill-anqas tliet esperimenti indipendenti ta' thawwid bil-mod.

Determinazzjoni tal-hin ta' ekwilibrazzjoni

39. Huwa preżunt li l-ekwilibriju jinkiseb meta rigressjoni tal-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' 1-ottanol/ilma mal-hin tul intervall ta' hin ta' erba' punti ta' hin trendi angolu li ma jkunx differenti b'mod sinifikanti minn zero f'livell p ta' 0,05. Il-hin minimu ta' ekwilibrazzjoni huwa ta' jum qabel ma jinbada jittiehed il-kampjun. Bħala regola, it-tehid ta' kampjuni ta' sustanzi bi stima ta' log P_{OW} ta' anqas minn hamsa 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' tehid ripetut ta' kampjuni ta' reċipjent wiehed.

Bidu tal-esperiment

40. Fil-bidu tal-esperiment ir-reċipjent ta' reazzjoni jimtela bl-ilma saturat b'1-ottanol. Għandu jithalla jkun hemm hin biżżejjed biex tintlaħaq it-temperatura tat-termostat.
41. L-ammont mixtieq ta' sustanza għall-ittestjar (mahlula fil-volum mehtieg ta' 1-ottanol saturat bl-ilma) tiżdied b'attenzjoni fir-reċipjent ta' reazzjoni. Dan huwa stadju kruċjali fl-esperiment, minhabba li għandu jkun evitat it-tahlit b'turbulenza taż-żewġ fażijiet. Għal dak il-ghan, il-fażi ta' 1-ottanol tista' tghaddi bil-mod minn pipetta mal-hajt tar-reċipjent sperimentali, qrib il-wieċ tal-ilma. Wara tghaddi fi fluss tul il-hajt tal-hgieg u tiffurma rita 'l fuq mill-fażi tal-ilma. Id-dikantar ta' 1-ottanol direttament fil-flixkun għandu dejjem jiġi evitat; it-taqiriet ta' 1-ottanol m'għandhomx jithallew jaqgħu direttament fl-ilma.
42. Wara li jibda t-thawwid, ir-rata ta' thawwid għandha tiżdied bil-mod. Jekk il-muturi tat-thawwid ma jkunx jistgħu jiġu aġġustati sewwa għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' trasformatur. Ir-rata ta' thawwid għandha tiġi aġġustat sabiex tinholoq il-vortici fil-interfaċċa bejn l-ilma u 1-ottanol ta' fond ta' 0,5 għal massimu ta' 2,5 cm. Ir-rata ta' thawwid għandha titnaqqas jekk il-fond tal-vortici jaqbeż it-2,5 cm; inkella jistgħu jiffurmaw taqiriet mikro mit-taqiriet 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' thawwid 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' taqiriet mikro ta' 1-ottanol.

▼ **M4***Tehid ta' Kampjuni u Trattament tal-Kampjuni*

43. Il-hawwad għandu jintefa qabel ma jittiehdu l-kampjuni u l-likwidi għandhom jithallew jieqfu milli jiċċaqalqu. Wara li jitlestha t-tehid tal-kampjuni, il-hawwad jerga' jitqabbad bil-mod, kif deskritt hawn fuq, u mbagħad ir-rata ta' thawwid tiżdied gradwalment.
44. Il-faži tal-ilma jittehdilha kampjun minn rubinett tal-gheluq fil-qiegh tar-riċipjent ta' reazzjoni. Skarta dejjem il-volum mejjet ta' ilma li jkun hemm fil-vitijiet (madwar 5 ml fir-riċipjent muri fl-Appendiċi 2). L-ilma fil-vitijiet ma jithawwadx 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 minhabba l-evaporazzjoni għandhom ikunu mminimizati billi l-ilma jithalla 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 tittiehed alikwota żgħira (madwar 100 µl) mis-saff ta' 1-ottanol b'siringa ta' 100 mikrolitru kollha kemm hija tal-ħgieġ u l-metall. Għandha tingħata attenzjoni li l-limitu ma jitqallibx. Il-volum tal-likwidu li jkun ittehdiedlu kampjun jiġi rreġistrat. Alikwota żgħira hija biżżejjed, minhabba li l-kampjun ta' 1-ottanol se jiġi dilwit.
46. Stadji mhux meħtieġa ta' trasferiment ta' kampjuni għandhom ikunu evitati. Għal dak il-ghan 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 RAPPORTAR

47. Skont dan il-Metodu ta' Ttestjar, P_{OW} ikun iddeterminat billi jsiru tliet esperimenti ta' thawwid bil-mod (tliet unitajiet sperimentali) bil-kompost li jkun qed jiġi investigat li juża kundizzjonijiet identiċi. Ir-rigressjoni uzata 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' hin. Dan jippermetti li tkun ikkalkulata varjanza bħala kejl tal-incertezza 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 piz 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 analogiku, 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 hafna f'laboratorju wieħed. It-trattament formali tal-istatistika tad-dejta jinsab spjegat hawn taht.

▼ **M4****Trattament tar-riżultati***Wiri ta' kisba ta' ekwilibriju*

50. Il-logaritmu tal-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar f'1-ottanol u ilma ($\log(C_o/C_w)$) huwa kkalkulat għal kull hin ta' teħid ta' kampjuni. Il-kisba ta' ekwilibriju kimiku tintwera billi dan il-proporzjon jiffassal f'konfront mal-hin. Livell kostanti f'din il-grafika li jkun ibbazat f'mill-anqas fuq erba' punti konsekuttivi ta' hin jindika li jkun inkiseb ekwilibriju, u li l-kompost ikun inhall tassew f'1-ottanol. Jekk le, it-test ikun jeħtiegħu jtkompla sakemm erba' punti suċċessivi ta' hin 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-hin.

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-hin, li għalih ikun intwera l-ekwilibriju. Il-medja peżata hija kkalkulata billi d-dejta tintiżen mal-invers tal-varjanza sabiex l-influenza tad-dejta fuq ir-riżultati 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:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

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' $\log P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$) li mbagħad ikun kejl tal-iżball assoċjat ma' $\log P_{OW,Av}$. Id-devjazzjoni standard peżata tista' tiġi kkompjuta mill-varjanza peżata $\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$ kif ġej:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

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

▼ M4**Rapport tat-test**

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

Sustanza għall-ittestjar:

- isem komuni, isem tal-kimika, numru tal-CAS, formula strutturali (li tindika l-pożizzjoni tat-tikketta meta tintuża sustanza b'tikketta radjoloġika) u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti (ara l-paragrafu 17);
- purezza (impuritajiet) tas-sustanza għall-ittestjar;
- purezza tat-tikketta ta' kimiċi b'tikketta u attività molari (fejn jixraq);
- stima preliminari ta' $\log P_{ow}$, kif ukoll il-metodu użat biex johroġ il-valur.

Kundizzjonijiet tat-test:

- dati tat-twettiq tal-istudji;
- temperatura matul l-esperiment;
- volumi ta' l-ottanol u ilma fil-bidu tat-test;
- volumi ta' kampjuni mehudin ta' l-ottanol u ilma;
- volumi ta' l-ottanol u ilma li jifdal fir-reċipjenti tat-test;
- deskrizzjoni tar-reċipjenti tat-test u tal-kundizzjonijiet tat-thawwid (ġeometrija tal-virga tat-thawwid u tar-reċipjent tat-test, l-għoli tal-vortiči f'mm, u meta disponibbli: rata ta' thawwid) użati;
- metodi analitiċi użati biex ikunu ddeterminati s-sustanza għall-ittestjar u l-limitu tal-metodu ta' kwantifikazzjoni;
- hinijiet ta' tehid ta' kampjuni;
- il-pH tal-fażi fl-ilma u l-baġers użati, meta l-pH ikun aġġustat għal molekuli jonizzabbli;
- għadd ta' replikati.

Riżultati:

- ripetibbiltà u sensitività tal-metodi analitiċi użati;
- konċentrazzjonijiet iddeterminati tas-sustanza għall-ittestjar f' l-ottanol u ilma bħala funzjoni ta' hin;
- 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-hin;
- il-valur medju ta' $\log P_{ow,Av}$ u l-iżball standard tiegħu;
- diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;

▼ **M4**

- eżempji ta' ċifri ta' dejta mhux maħduma ta' analizi rappreżentattiva (id-dejta kollha mhux maħduma għandha tinhażen skont standards tal-GLP), inkluzi rkupri ta' sostituti, u l-ghadd 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' analizi (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 – Idrolizi ta' Degradazzjoni Abijotika bħala Funzjoni ta' pH.
- (12) Il-Kapitolu C.4 - Parti II – VII (Metodu A sa F) ta' dan l-Anness, Determinazzjoni ta' Bijodegradabilità "Faċli".
- (13) Il-Kapitolu A.4 ta' dan l-Anness, Pressjoni tal-Fwar.
- (14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.
- (15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.
- (16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- (17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
- (18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.
- (19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Kanada, 2001.

▼M4

- (20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
- (21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.
- (22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼ **M4***Appendiċi 1***Spreadsheet għall-komputazzjoni ta' volumi minimi ta' ilma mehtieġ għall-detezzjoni ta' sustanzi għall-ittestjar ta' valuri differenti ta' log P_{ow} fil-fażi fl-ilma**

Suppożizzjonijiet:

- Volum massimu ta' alikwoti individwali = 10 % tal-volum totali; 5 alikwoti = 50 % tal-volum totali.
- Koncentrazzjoni ta' sustanzi għall-ittestjar = $0,7 \times$ solubilità f'fażi wahda jew ohra. F'każ ta' koncentrazzjonijiet aktar baxxi, ikunu mehtieġa volumi akbar.
- Volum użat għal determinazzjoni ta' LOD = 100 ml.
- log P_{ow} vs. log S_w u log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) huma rappreżentazzjonijiet raġonevoli ta' relazzjonijiet għal sustanzi għall-ittestjar.

Stima ta' S_w

log P _{ow}	ekwazzjoni	log S _w	S _w (mg/l)
4	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,035	1,084E+00
5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	- 0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	- 0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	- 1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	- 1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	- 2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	- 2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	- 3,192	6,427E-04

Stima ta' S_{oct}

log P _{ow}	ekwazzjoni	S _{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

▼ **M4**

Total tal-Massa tas-sustanza għall-ittestjar (mg)	Massa _{oct} /Massa _{ilma}	Massa _{H₂O} (mg)	Conc _{H₂O} (mg/l)	Massa _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Komputazzjoni ta' volumi

Volum minimu mehtieġ għal fażi ta' H₂O 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.

▼M4

Prospett ta' volumi meħtieġa, bħala funzjoni ta' solubilità fl-ilma u Log P_{ow}Volum minimu meħtieġ għal fażi ta' H₂O f'kull konċentrazzjoni ta' LOD (ml)

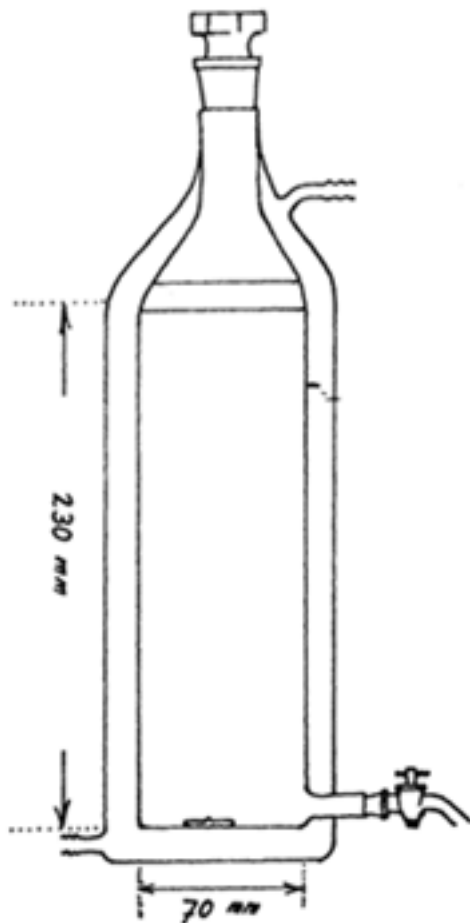
log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼ **M4**

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (micrograms/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volum użat għal LOD (l)		0,1					

▼ M4*Appendiċi 2*

Eżempju ta' reċipjent tat-test imdawwar bil-ħġieġ għall-esperiment ta' thawwid bil-mod għal determinazzjoni ta' P_{OW}



▼ M6

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

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar tal-OECD (TG) 117 (2004)

1. Il-koeffiċjent ta' partizzjoni (P) huwa ddefinit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjonijiet tal-ekwilibriju ta' sustanza mahlula f'sistema b'żewġ fażijiet li tikkonsisti f'żewġ solvanti li fil-parti l-kbira ma jistgħux jithalltu. Fil-każ ta' n-ottanol u ilma,

$$P_{ow} = \frac{C_n - octanol}{C_{water}}$$

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni li huwa l-kwozjent ta' żewġ konċentrazzjonijiet, huwa mingħajr dimensjoni u normalment jingħata fil-forma tal-logaritma tiegħu għal bażi ta' għaxra.

2. P_{ow} huwa parametru ewlieni fl-istudji tad-destin ambjentali tas-sustanzi kimiċi. Intweriet relazzjoni sinifikanti haġna bejn il- P_{ow} ta' forma mhux jonizzata ta' sustanzi u l-bijoakkumulazzjoni tagħhom fil-hut. Intwera wkoll li P_{ow} huwa parametru utli fit-tbassir tal-adsorbiment fil-hamrija u n-naqal u għall-istabbiliment ta' relazzjonijiet bejn l-istruttura u l-attività kwantitattivi għal firxa wiesgħa ta' effetti bijoloġiċi.
3. Il-proposta oriġinali għal dan il-metodu ta' ttestjar kienet ibbażata fuq artiklu minn C.V. Eadsforth u P. Moser (1). L-iżvilupp tal-metodu ta' ttestjar u test ta' tqabbil bejn il-laboratorji tal-OECD kienu kkoordinati mill-Umweltbundesamt tar-Repubblika Federali tal-Ġermanja matul l-1986 (2).

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

4. Valuri log P_{ow} fil-medda – 2 sa 4 (xi drabi sa 5 u iktar) ⁽¹⁾ jistgħu jiġu determinati b'mod sperimentali bil-metodu Flask tat-Theżziż (Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, Linja Gwida tat-Test 107 tal-OECD). Il-metodu HPLC ikopri log P_{ow} fil-medda ta' 0 sa 6 (1)(2)(3)(4)(5). Dan il-metodu jaf ikun jeħtiġ stima tal- P_{ow} biex jassenja s-sustanzi ta' referenza xierqa u jappoġġja kwalunkwe konkluzjoni mahruġa mid-dejta ġġenerata mit-test. Il-metodi ta' kalkolu huma diskussi fil-qosor fl-Appendiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Il-modalità ta' operazzjoni HPLC hija isokratika.
5. Il-valuri tal- P_{ow} jiddependu mill-kundizzjonijiet ambjentali bħat-temperatura, il-pH, is-saħħa jonika eċċ, u dawn għandhom jiġu ddefiniti fl-esperiment għall-interpretazzjoni korretta tad-dejta dwar il- P_{ow} . Għal sustanzi jonizzabbli, metodu ieħor (eż. abbozz tal-linja gwida tal-OECD dwar il-metodu metriku tal-pH għal sustanzi jonizzati (6)) jista' jsir disponibbli u jista' jintuża bħala metodu alternattiv. Għalkemm dan l-abbozz tal-lingwa gwida tal-OECD jaf ikun xieraq biex jiġi ddeterminat il- P_{ow} għal dawn is-sustanzi jonizzabbli, f'xi każijiet huwa iktar xieraq li jintuża l-metodu HPLC f'pH ambjentalment rilevanti (ara l-paragrafu 9).

⁽¹⁾ Jingħata limitu superjuri minhabba l-htieġa li tintlahaq fażi ta' separazzjoni kompleta wara l-aġġustamenti tal-ekwilibriju tal-partizzjoni u qabel jittiehdu kampjuni għal analizzjiet kwantitattivi. Jekk tingħata attenzjoni xierqa, il-limitu superjuri jista' jiġi estiz għal valuri oghla ta' P_{ow}

▼ M6

PRINĊIPJU TAL-METODU

6. Titwettaq HPLC f'fażi inversa fuq kolonni analitiċi ppakkjati b'fażi solida kummerċjalment disponibbli li fihom ktajjen tal-idrokarburi twal (eż. C_8 , C_{18}) magħqud kimikament mas-silicju.
7. Sustanza kimika injettata f'tali partizzjonijiet tal-kolonna bejn il-faži tas-solvent mobbli u l-faži stazzjonarja tal-idrokarburi hekk kif tiġi ttrasportata tul il-kolonna mill-faži mobbli. Is-sustanzi jinżammu f'proporzjon tal-koeffiċjent ta' partizzjoni idrokarbur/ilma tagħhom, b'sustanzi idrofiliċi elwiti l-ewwel u sustanzi lipofiliċi l-aħħar. Il-hin ta' zamma huwa deskritt mill-fattur ta' kapacià k ikkalkolat bl-espressjoni:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

fejn t_R huwa l-hin ta' zamma tas-sustanza tat-test, u t_0 huwa l-hin mejjiet, jiġifieri l-hin medju li molekula tas-solvent tehtieg biex tgħaddi mill-kolonna. Mhumix mehtieġa metodi analitiċi kwantitattivi u hija mehtieġa biss id-determinazzjoni tal-hinijiet ta' zamma.

8. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ottanol/ilma ta' sustanza tat-test jista' jiġi kkalkolat billi jiġi ddeterminat b'mod sperimentali l-fattur tal-kapacià k tiegħu fejn imbagħad jiddaħħal k fl-ekwazzjoni li ġejja:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

fejn

a, b = koeffiċjenti ta' rigressjoni lineari.

L-ekwazzjoni ta' hawn fuq tista' tinkiseb bir-rigressjoni lineari tal-log tal-koeffiċjenti ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanzi ta' referenza kontra l-log tal-fatturi ta' kapacià tas-sustanzi ta' referenza.

9. Il-metodu HPLC f'fażi inversa jippermetti li jiġu stmati l-koeffiċjenti ta' partizzjoni fil-medda tal-log P_{ow} bejn 0 u 6, iżda jista' jiġi estiż biex ikopri l-medda tal-log P_{ow} bejn 6 u 10 f'każijiet eċċezzjonali. Dan jaf ikun jehtieġ li tiġi mmodifikata l-faži mobbli (3). Il-metodu mhuwiex applikabbli għal aċidi u bażijiet b'saħħithom, kumplessi tal-metalli, sustanzi li jkollhom reazzjoni mal-elwent, jew aġenti tensjoattivi. Il-miżuri jistgħu jitwettqu fuq sustanzi jonizzabbli fil-forma mhux jonizzata tagħhom (aċidu hieles jew baži hielsa) biss permezz ta' bafer xieraq b'pH taht il- pK_a għal aċidu hieles jew iktar mill- pK_a għal baži hielsa. Inkella, il-metodu metriku tal-pH għall-itestjar ta' sustanzi jonizzabbli (6) jista' jitqiegħed għad-dispożizzjoni u jista' jintuża bħala metodu alternattiv (6). Jekk il-valur tal-log P_{ow} jiġi ddeterminat għall-użu f'klassifikazzjoni tal-perikli tal-ambjent jew f'valutazzjoni tar-riskju ambjentali, it-test għandu jitwettaq fil-medda ta' pH rilevanti għall-ambjent naturali, jiġifieri fil-medda tal-pH ta' 5,0 - 9.
10. F'xi każijiet, l-impurità jistgħu jagħmlu l-interpretazzjoni tar-riżultati diffiċli minhabba l-inċertezza fl-assenjazzjonijiet tal-ogħla livelli. Għal tahlitiet li jirriżultaw f'faxxa mhux riżolta, għandhom jiġu rrapportati l-limiti superjuri u inferjuri tal-log P_{ow} , u l- % taż-żona tal-ogħla livelli tal-log P_{ow} kollha. Għal tahlitiet li huma gruppi ta' omologi, għandu jiġi ddikjarat ukoll il-log P_{ow} medju ppeżat (7), ikkalkolat abbażi ta' valuri P_{ow} uniċi u l-valuri korrispondenti tal- % taż-żona (8). L-ogħla livelli kollha li jikkontribwixxu għal żona ta' 5 % jew iktar għaž-żona totali tal-ogħla livell għandhom jitqiesu fil-kalkolu (9):

▼ M6

$$\text{weighted average log } P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{area } \%)}{\text{total peak area } \%} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\text{area } \%_i)}{\sum_i \text{area } \%}$$

Il-log P_{ow} medju mwiezen huwa validu biss għal sustanzi jew tahlitiet (eż. żjut twal) li jikkonsistu f'omologi (eż. serje ta' alkani). It-tahlitiet jistgħu jitkejlu b'riżultati sinifikanti, sakemm ir-rilevatur analitiku użat ikollu l-istess sensitività għas-sustanzi kollha fit-tahlita u jistgħu jiġu riżolti b'mod adegwat.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

11. Il-kostant ta' dissoċjazzjoni, il-formula strutturali, u s-solubbiltà fil-fażi mobbli għandhom ikunu magħrufin qabel jintuża l-metodu. Barra minn hekk, informazzjoni dwar l-idroloġi tkun utli.

KRITERJI TAL-KWALITÀ

12. Sabiex tizzied il-kunfidenza fil-kejl, għandhom isiru determinazzjonijiet doppji.

— Ripetibbiltà: Il-valur tal-log P_{ow} minn kejljet ripetuti li jittiehdu f'kundizzjonijiet identiċi u permezz tal-istess sett ta' sustanzi ta' referenza għandu jaqqa' fi hdan medda ta' $\pm 0,1$ tal-unitajiet tal-log.

— Riproduċibbiltà: Jekk il-kejljet jiġu ripetuti b'sett ta' sustanzi ta' referenza differenti, ir-riżultati jaf ivarjaw. Generalment, il-koeffiċjent ta' korrelazzjoni R għar-relazzjoni bejn il-log k u l-log P_{ow} għal sett ta' sustanzi tat-test huwa ta' madwar 0,9, li jikkorrispondi għal koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tal-log $P_{ow} \pm 0,5$ unitajiet tal-log.

13. It-test tal-tqabbil bejn il-laboratorji wera li bil-metodu HPLC, il-valuri tal-log P_{ow} jistgħu jinkisbu sa fi hdan $\pm 0,5$ unitajiet tal-valuri tal-Flask tat-Theżiż (2). Paraguni oħra jistgħu jinstabu fid-dokumentazzjoni (4)(5)(10)(11)(12). Graffs ta' korrelazzjoni bbażati fuq sustanzi ta' referenza strutturalment relatati jagħtu l-iktar riżultati preċiżi (13).

SUSTANZI TA' REFERENZA

14. Sabiex il-fattur tal-kapaċità k imkejjel jiġi kkorrelat mal- P_{ow} tiegħu, irid jiġi stabbilit graff ta' kalibrizzjoni permezz ta' mill-anqas 6 punti (ara l-paragrafu 24). Huwa f'idejn l-utent li jagħzel is-sustanzi ta' referenza xierqa. Normalment is-sustanzi ta' referenza għandu jkollhom valuri tal-log P_{ow} li jinkludu l-log P_{ow} tas-sustanza tat-test, jiġifieri tal-inqas sustanza ta' referenza wahda għandu jkollha P_{ow} oghla minn dak tas-sustanza tat-test, u oħra P_{ow} inqas minn dak tas-sustanza tat-test. L-estrapolazzjoni għandha tintuża biss f'każijiet eċċezzjonali. Idealment dawn is-sustanzi ta' referenza jkunu strutturalment relatati mas-sustanza tat-test. Il-valuri tal-log P_{ow} tas-sustanzi ta' referenza użati għall-kalibrizzjoni għandhom ikunu bbażati fuq dejta sperimentali affidabbli. Madankollu, għal sustanzi b'log P_{ow} għoli (generalment iktar minn 4), jistgħu jintużaw il-valuri kkalkolati sakemm ma tkunx disponibbli dejta sperimentali affidabbli. Jekk jintużaw valuri estrapolati, għandu jiġi kkwotat valur ta' limitu.
15. Huma disponibbli listi estensivi ta' valuri tal-log P_{ow} għal hafna gruppi ta' sustanzi kimiċi (14)(15). Jekk dejta dwar il-koeffiċjent ta' partizzjoni tas-sustanzi strutturalment relatati ma tkunx disponibbli, tista' tintuża kalibrizzjoni iktar generali, stabbilita b'sustanzi ta' referenza oħra. Sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-valuri P_{ow} tagħhom huma elenkati fit-Tabella 1. Għal sustanzi jonizzabbli, il-valuri mogħtija japplikaw għall-forma mhux jonizzata. Il-valuri kienu ċċekkjati għall-plawżibbiltà u l-kwalità matul it-test ta' tqabbil bejn il-laboratorji.

▼ **M6**

Tabella 1

Sustanzi ta' referenza rakkomandati

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P _{ow}	pKa
1	78-93-3	2-Butanon (Metiletilketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-Aċetilpiridina	0,5	
3	62-53-3	Anilinea	0,9	
4	103-84-4	Aċetanilid	1,0	
5	100-51-6	Alkohol benziliku	1,1	
6	150-76-5	4-Metossifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Aċidu fenossiaċetiku	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Fenilaċetonitril	1,6	
12	589-18-4	Alkohol 4-metilbenzil	1,6	
13	98-86-2	Aċetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	Aċidu 3-nitrobenzojku	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Kloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenžen	1,9	
18	104-54-1	Alkohol taċ-ċinnamil (Alkohol ċinnamiku)	1,9	
19	65-85-0	Aċidu benzojku	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Kreżol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Aċidu ċinnamiku	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Aniżol	2,1	
23	93-58-3	Metilbenzoat	2,1	
24	71-43-2	Benžen	2,1	
25	99-04-7	Aċidu 3-metilbenzojku	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Klorofenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trikloroetilen	2,4	
28	1912-24-9	Atrażina	2,6	
29	93-89-0	Benzoat tal-etil	2,6	

▼ **M6**

	Numru CAS	Sustanza ta' referenza	log P _{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-Diklorobenżonitril	2,6	
31	535-80-8	Acidu 3-klorobenżojku	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluwen	2,7	
33	90-15-3	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dikloroanilina	2,8	
35	108-90-7	Klorobenżen	2,8	
36	1746-13-0	Eter tal-fenil tal-allil	2,9	
37	108-86-1	Bromobenżen	3,0	
38	100-41-4	Etilbenżen	3,2	
39	119-61-9	Benzofenon	3,2	
40	92-69-3	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Diklorobenżen	3,4	
43	122-39-4	Difenilamina	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Fenilbenżoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropilbenżen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Triklorofenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	Benzilbenżoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sek-butilfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Triklorobenżen	4,2	
52	143-07-7	Acidu dodekanojku	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Etere tad-difenil	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-Butilbenżen	4,6	
56	103-29-7	Dibenzil	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Difenilpiridina	4,9	
58	206-44-0	Fluworanten	5,1	
59	603-34-9	Trifenilamina	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼ **M6****DESKRIZZJONI TAL-METODU****Stima preliminari tal-koeffiċjenti ta' partizzjoni**

16. Jekk ikun hemm bżonn, il-koeffiċjent ta' partizzjoni tas-sustanza tat-test jista' jiġi stmat idealment permezz ta' metodu ta' kalkolu (ara l-Appendiċi, jew fejn ikun xieraq, permezz tal-proporzjon tas-solubbiltà tas-sustanza tat-test fis-solventi puri.

Apparat

17. Huwa meħtieġ kromatografu b'fażi likwida mghammar b'pompa b'ritmu baxx u sistema ta' detezzjoni xierqa. Huwa applikabbli rilevatur tal-UV, li juża tul ta' mewġa ta' 210 nm, jew rilevatur tal-RI għal varjetà wiesgħa ta' gruppi ta' sustanzi kimiċi. Il-preżenza ta' gruppi polari fil-faży stazzjonarja tista' serjament ixxejjel il-prestazzjoni tal-kolonna HPLC. Għalhekk, il-fażijiet stazzjonarji għandu jkollhom perċentwal minimu ta' gruppi polari (16). Jista' jintuża ppakkjar f'faży inversa tal-mikropartikulati kummerċjali jew kolonni ppakkjati bil-lest. Tista' titqiegħed kolonna ta' lqugħ bejn is-sistema ta' injezzjoni u l-kolonna analitika.

Faży mobbli

18. Jintużaw metanol tal-grad HPLC u ilma dejonizzat jew distillat biex jithejja s-solvent ta' elużjoni, li jitneħħielu l-gass qabel jintuża. Għandha tintuża elużjoni isokratika. Għandhom jintużaw proporzjonijiet ta' metanol/ilma b'kontenut minimu ta' ilma ta' 25 %. Generalment tahlita ta' 3:1 (v/v) metanol/ilma hija sodisfaċenti għall-elużjoni ta' sustanzi b'log P ta' 6 fi żmien siegħa, b'rata ta' fluss ta' 1 ml/min. Għal sustanzi b'log P ikbar minn 6, jaf ikun hemm bżonn li jitqassar il-hin ta' elużjoni (u dawk tas-sustanzi ta' referenza) billi titnaqqas il-polarità tal-faży mobbli jew it-tul tal-kolonna.
19. Is-sustanza tat-test u s-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu solubbli fil-faży mobbli f'konċentrazzjoni suffiċjenti li tippermetti d-detezzjoni tagħhom. Jistgħu jintużaw addittivi mat-tahlita ta' metanol/ilma f'każijiet eċċezzjonali biss, peress li dawn jibdli l-proprietajiet tal-kolonna. F'dawn il-każijiet, għandu jiġi kkonfermat li l-hin ta' żamma tas-sustanzi tat-test u ta' referenza mhumiex influwenzati. Jekk it-tahlita ta' metanol/ilma ma tkunx xierqa, jistgħu jintużaw tahlitiet ta' solvent/ilma organiċi oħrajn, eż. etanol/ilma, aċetonitril/ilma jew isopropil alkoħol (2-propanol)/ilma.
20. Il-pH tal-elwent huwa essenzjali għal sustanzi jonizzabbli. Għandu jkun fi hdan il-medda pH operattiva tal-kolonna, generalment bejn 2 u 8. Huwa rakkomandat ibbaferjar. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu evitati preċipitazzjoni tal-melħ u tgharriq tal-kolonna li jseħhu b'xi tahlitiet tal-faży/bafer organiċi. Il-kejl tal-HPLC b'fażijiet stazzjonari bbażati fuq is-siliċju b'pH oghla minn 8 normalment mhumiex rakkomandati peress li l-użu ta' faży mobbli alkalina tista' tikkawża tgharriq fil-prestazzjoni tal-kolonna.

Soluti

21. Is-sustanzi tat-test u ta' referenza għandhom ikunu kemm jista' jkun puri bizżejjeċ sabiex jiġu assenjati l-oghla livelli fil-kromatogrammi għas-sustanzi rispettivi. Is-sustanzi li għandhom jintużaw għall-finijiet tal-ittestjar jew il-kalibrazzjoni jinħallu fil-faży mobbli jekk ikun possibbli. Jekk solvent minbarra l-faży mobbli jintuża biex iħoll is-sustanzi tat-test u ta' referenza, il-faży mobbli għandha tintuża għad-dilwizzjoni finali qabel l-injezzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test

22. It-temperatura matul il-kejl ma għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1 °C.

▼ **M6****Determinazzjoni tal-hin mejjet t_0**

23. Il-hin mejjet t_0 jista' jitkejjel permezz ta' sustanzi organiċi mhux miżmuma (eż. tjourea jew formamid). Jista' jiġi derivat hin mejjet iktar preċiż mill-hinijiet ta' żamma mkejla jew sett ta' madwar seba' membri ta' serje omologa (eż. n-alkil metil ketoni) (17). Il-hinijiet ta' żamma $t_R (n_C + 1)$ jiġu pplottjati mat- $t_R (n_C)$, fejn n_C huwa n-numru ta' atomi tal-karbonju. Tinkiseb linja dritta, $t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 - A)t_0$, meta A, li tirrappreżenta $k(n_C + 1)/k(n_C)$, tkun kostanti. Il-hin mejjet t_0 jinkiseb mill-interċett $(1 - A)t_0$ u l-gradjent A.

Ekwazzjoni ta' Rigressjoni

24. Il-pass li jmiss huwa li tiġi pplottjata korrelazzjoni ta' $\log k$ ma' $\log P$ għal sustanzi ta' referenza xierqa b'valuri $\log P$ qrib il-valur mistenni għas-sustanza tat-test. Fil-prattika, jiġu injettati minn 6 sa 10 sustanzi ta' referenza fl-istess hin. Il-perjodi ta' żamma huma ddeterminati, preferibbilment fuq integratur ta' reġistrazzjoni marbut mas-sistema ta' detezzjoni. Il-logaritmi korrispondenti tal-fatturi ta' kapaċità, $\log k$, huma pplottjati bhala funzjoni ta' $\log P$. L-ekwazzjoni ta' rigressjoni titwettaq f'intervalli regolari, tal-inqas darba kuljum, sabiex jittiehed kont tal-bidliet possibbli fil-prestazzjoni tal-kolonna.

DETERMINAZZJONI TAL- P_{OW} TAS-SUSTANZA TAT-TEST

25. Is-sustanza tat-test tiġi injettata fl-iżgħar kwantitajiet traċċabbli. Il-hin ta' żamma huwa ddeterminat darbtejn. Il-koeffiċjent tal-partizzjoni tas-sustanza tat-test, jinkiseb bl-interpolazzjoni tal-fattur tal-kapaċità kkalkolat fuq il-graff tal-kalibrazzjoni. Għal koeffiċjenti ta' partizzjoni baxxi hafna u għolja hafna, hija mehtieġa estrapolazzjoni. Speċjalment f'dawn il-każijiet, għandha tinghata attenzjoni lil-limiti ta' kunfidenza tal-linja ta' rigressjoni. Jekk il-hin ta' żamma tal-kampjun ma jaqax taħt il-medda tal-hinijiet ta' żamma miksuba għall-istandards, għandu jiġi kkwotat valur ta' limitu.

DEJTA U RAPPORTAR**Rapport tat-test**

26. Dan li ġej għandu jiġi inkluz fir-rapport:
- jekk tkun iddeterminata, l-istima preliminari tal-koeffiċjent tal-partizzjoni, il-valuri stmati u l-metodu użat; u jekk intuża metodu ta' kalkolu, id-deskrizzjoni shiħa tiegħu inkluz l-identifikazzjoni tal-bażi ta' dejta u informazzjoni ddettaljata dwar l-għażla tal-frammenti;
 - is-sustanzi tat-test ta' referenza: il-purità, il-formula strutturali u n-numru CAS,
 - deskrizzjoni tat-tagħmir u l-kundizzjonijiet operattivi: il-kolonna analitika, il-kolonna ta' lqugh,
 - il-fażi mobbli, il-mezzi ta' detezzjoni, il-medda tat-temperatura, il-pH;
 - il-profilu ta' elużjoni (kromatogrammi);
 - il-hin mejjet u kif tkejjel;
 - id-dejta u d-dokumentazzjoni dwar iż-żamma tal-valuri tal-log P_{ow} għal sustanzi ta' referenza użati fil-kalibrazzjoni;
 - dettalji dwar linja ta' rigressjoni mdaħħla ($\log k$ meta mqabbel ma' $\log P_{ow}$) u l-koeffiċjent ta' korrelazzjoni tal-linja inkluzi l-intervalli ta' kunfidenza;

▼ **M6**

- dejta ta' żamma medja u valur tal-log P_{ow} interpolat għas-sustanza tat-test;
- fil-każ ta' tahlita: il-kromatogramma tal-profil ta' elużjoni bil-valuri ta' limitu indikati;
- il-valuri tal-log P_{ow} relattivi għall- % taż-żona tal-oghla livell ta' P_{ow} ;
- kalkolu permezz ta' linja ta' rigressjoni;
- valuri tal-log P_{ow} medji ppeżati kkalkolati, fejn ikun xieraq.

LETTERATURA

- (1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere*. 17, 361.
- (3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pesticide Science*. 17, 311.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pesticide Science*. 12, 219.
- (5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere*. 10, 73.
- (6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.
- (7) OSPAR (1995). "Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environmental Modelling & Software* Vol. 13, pp. 529-537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere*. 9, 683.
- (11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chromatography* 247, 1.
- (12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromatography*. 7, 675.
- (13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Biomedical Materials Research*. 15, 787.

▼ M6

- (14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.
- (15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.
- (17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼ **M6***Appendiċi***Metodi ta' kalkolu tal-P_{ow}****INTRODUZZJONI**

1. Dan l-appendiċi jipprovdi introduzzjoni qasira għall-kalkolu tal-P_{ow}. Għal iktar informazzjoni, il-qarrej għandu jirreferi għall-kotba (1)(2).
2. Il-valuri kkalkolati tal-P_{ow} jintużaw għal:
 - deċiżjoni dwar liema metodu sperimentali għandu jintuża: Metodu tal-Flask Mhežżeż għal log P_{ow} bejn -2 u 4 u metodu HPLC għal log P_{ow} bejn 0 u 6;
 - l-għażla tal-kundizzjonijiet li għandhom jintużaw fl-HPLC (sustanzi ta' referenza, proporzjon ta' metanol/ilma);
 - il-verifika tal-plawżibbiltà tal-valuri miksuba permezz ta' metodi sperimentali;
 - l-għoti ta' stima meta ma jkunux jistgħu applikati metodi sperimentali.

Prinċipju tal-metodi ta' kalkolu

3. Il-metodi ta' kalkolu ssuġġeriti hawnhekk huma bbażati fuq il-frammentazzjoni teoretika tal-molekula f'sottostrutturi xierqa għal liema huma magħrufin židiet fil-log P_{ow} affidabbli. Il-log P_{ow} jinkiseb billi l-valuri tal-frammenti jżidiedu mat-termini ta' korrezzjoni għall-interazzjonijiet intramolekulari. Huma disponibbli listi ta' kostanti frammentati u termini ta' korrezzjoni (1)(2)(3)(4)(5)(6). Xi whud huma aġġornati regolarment (3).

Affidabbiltà tal-valuri kkalkolati

4. B'mod ġenerali, l-affidabbiltà tal-metodi ta' kalkolu tonqos hekk kif tiżdied il-komplessità tas-sustanza studjata. Fil-każ ta' molekuli sempliċi b'piż molekulari baxx u b'grupp funzjonali wiehed jew tnejn, wiehed jista' jistenna devjazzjoni ta' 0,1 sa 0,3 unitajiet ta' log P_{ow} bejn ir-risultati tal-metodi ta' frammentazzjoni differenti u l-valuri mkejla. Il-marġni ta' żball sejjer jiddependi fuq l-affidabbiltà tal-kostanti tal-frammenti użati, il-hila li jingħarfu l-interazzjonijiet intramolekulari (eż. ir-rabtiet tal-idroġenu) u l-użu xieraq tat-termini ta' korrezzjoni. Fil-każ ta' sustanzi jonizzanti, iċ-ċarġ u l-grad ta' jonizzazzjoni għandhom jittiehdu inkunsiderazzjoni (10).

Metodu Fujita-Hansch π

5. Il-kostant tas-sostitwent idrofobiku, π , introdott oriġinarjament minn Fujita et al. (7) huwa ddefinit bħala:

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

fejn PhX huwa derivattiv aromatiku u PhH huwa s-sustanza ewlenija.

$$\begin{aligned} \text{eż. } \pi_{\text{Cl}} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 \\ &\geq 0,71 \end{aligned}$$

Il- π -metodu huwa primarjament ta' interess għal sustanzi aromatiċi. Huma disponibbli valuri- π għal numru kbir ta' sostitwenti (4)(5).

Metodu Rekker

6. Permezz tal-metodu Rekker (8) il-valur tal-P_{ow} huwa kkalkolat bħala:

$$\text{Log}P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interaction terms})$$

▼ **M6**

fejn a_i huwa n-numru ta' drabi li jsehh framment partikolari fil-molekula u f_i huwa z -zieda fil- P_{ow} tal-framment. It-termini ta' interazzjoni jistghu jiġu espressi bħala multipli integrali ta' kostanti wiehed C_m (l-hekk imsejjah "kostanti maġiku"). Il-kostanti tal-framment f_i u C_m ġew iddeterminati minn lista ta' 1 054 valur P_{ow} sperimentali ta' 825 sustanza permezz ta' analizi tar-rigressjoni tal-multipli (6)(8). Id-determinazzjoni tat-termini ta' interazzjoni ssir skont regoli stabbiliti (6)(8)(9).

Metodu Hansch-Leo

7. Permezz tal-metodu Hansh u Leo (4), il-valur tal-log P_{ow} huwa kkalkolat bħala:

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

fejn f_i huwa kostant tal-framment, F_j terminu ta' korrezzjoni (fattur), a_i u b_j il-frekwenza korrispondenti tal-okkorrenza. Lista ta' valuri frammentali atomiċi u tal-grupp tat-termini ta' korrezzjoni F_j kienet idderivata b'approssimazzjoni minn valuri P_{ow} sperimentali. It-termini tal-korrezzjoni tqassmu f'diversi klassijiet differenti (1)(4). Il-pakketti tas-softwer ġew żviluppati biex iqisu r-regoli u t-termini ta' korrezzjoni kollha (3).

METODU KKOMBINAT

8. Il-kalkolu tal-log P_{ow} ta' molekuli kumplessi jista' jittejjeb b'mod konsiderevoli, jekk il-molekula tinqasam f'sottostrutturi ikbar għal liema jkun disponibbli valuri log P_{ow} affidabbli mit-tabelli (3)(4) jew minn miżuri eżistenti. Imbagħad, it-tali frammenti (eż. eteroċikli, antrakina, azobenżen) jistghu jiġu kkombinati mal-valuri Hansch π jew mal-kostanti tal-frammenti ta' Rekker jew Leo.

Rimarki

- i) Il-metodi ta' kalkolu huma applikabbli biss ma' sustanzi parzjalment jew kompletament jonizzati meta jitqiesu l-fatturi ta' korrezzjoni meħtieġa.
- ii) Jekk wiehed jista' jassumi l-eżistenza ta' rabtiet tal-idroġenu intramolekulari, għandhom jiġdiedu t-termini ta' korrezzjoni korrispondenti (madwar + 0,6 sa + 1,0 unitajiet ta' log P_{ow}) (1). Indikazzjonijiet dwar il-preżenza ta' tali rabtiet tista' tinkiseb minn mudelli tridimensjonali jew dejta spektroskopika.
- iii) Jekk ikunu possibbli diversi forom tawtomeriċi, l-iktar forma probabbli għandha tintuża bħala l-bażi tal-kalkolu.
- iv) Ir-reviżjonijiet tal-listi ta' kostanti frammentati għandhom jiġu segwiti b'attenzjoni.

LETTERATURA DWAR IL-METODI TA' KALKOLU

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).

▼ M6

- (5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews.* 71, 525.
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.
- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.
- (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.
- (10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼ **M7****A.25. KOSTANTI TA' DISSOĊJAZZJONI FL-ILMA (METODU TA' WINKLER — METODU SPETTROFOTOMETRIKU — METODU KONDUTTOMETRIKU)****INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 112 (1981) tal-OECD

Prerekwiziti

— Metodu analitiku xieraq

— Is-solubilità fl-ilma

Informazzjoni ta' gwida

— Formula strutturali

— Il-konduttività elettrika għall-metodu konduttometriku

Dikjarazzjonijiet kwalifikati

— Il-metodi ta' ttestjar jistgħu jsiru fuq sustanzi puri jew ta' grad kummerċjali. Għandhom jiġu kkunsidrati l-effetti possibbli tal-impurità fuq ir-riżultati.

— Il-metodu ta' Winkler mhuwiex adattat għal sustanzi b'solubilità baxxa (ara Soluzzjonijiet tat-test, iktar 'il quddiem).

— Il-metodu spettrofotometriku huwa applikabbli biss għal sustanzi li għandhom spettri tal-assorbiment tal-UV/VIS effettivament differenti għall-forom dissoċjati u mhux dissoċjati. Dan il-metodu jista' jkun adattat ukoll għal sustanzi b'solubilità baxxa u għal dissoċjazzjonijiet mhux aċidi/baži, eż. formazzjoni kumplessa.

— Fil-każijiet li fihom tapplika l-ekwazzjoni ta' Onsager, jista' jintuża l-metodu konduttometriku, anki f'koncentrazzjonijiet moderatament baxxi u anki f'każijiet għal ekwilibriji mhux aċidi/baži.

Dokumenti standard

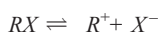
Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq metodi mogħtijin fir-referenzi elenkati fit-taqsimha "Tagħrif" u fil-Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA tat-18 ta' Awwissu, 1978.

METODU — INTRODUZZJONI, SKOP, KAMP TA' APPLIKAZZJONI, RILEVANZA, APPLIKAZZJONI U LIMITI TAT-TEST

Id-dissoċjazzjoni ta' sustanza fl-ilma hija ta' importanza fil-valutazzjoni tal-impatt tagħha fuq l-ambjent. Tirregola l-forma tas-sustanza li min-naħa tagħha tistabbilixxi l-imġiba u t-trasport tagħha. Tista' taffettwa l-adsorbiment tas-sustanza kimika fuq il-hamriji u s-sedimenti u l-assorbiment fiċ-ċelloli bijoloġiċi.

Definizzjonijiet u unitajiet

Id-dissoċjazzjoni hija l-qsim irriversibbli f'zewġ speċijiet kimiċi jew iktar li jistgħu jkun joniċi. Generalment il-proċess ikun indikat bi



u l-kostant ta' ekwilibriju tal-koncentrazzjoni li jirregola r-reazzjoni huwa

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

Pereżempju, fil-każ partikolari li fih R huwa idroġenu (is-sustanza hija aċidu), il-kostant huwa

▼ **M7**

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

jew

$$pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

Sustanzi ta' referenza

Is-sustanzi ta' referenza li ġejjin mhux bilfors jintużaw fil-kazijiet kollha meta tiġi investigata sustanza ġdida. Primarjament jiġu pprovduti sabiex kultant ikun jista' jiġi kkalibrat il-metodu u sabiex tinghata l-possibbiltà li jitqabblu r-riżultati meta jiġi applikat metodu ieħor.

	pK _a ⁽¹⁾	Temp. f°C
p-Nitrofenol	7.15	25 ⁽¹⁾
Aċidu benzojku	4.12	20
p-Kloroanilina	3.93	20

⁽¹⁾ Ma hemm l-ebda valur disponibbli għal 20 °C, izda jista' jiġi supponut li l-varjabbiltà tar-riżultati tal-kejl hija ikbar mid-dipendenza tat-temperatura mistennija

Tajjeb li wiehed ikollu sustanza b'bosta pKs kif indikat fil-Prinċipju tal-metodu, hawn taht. Sustana bħal din tista' tkun:

Aċidu ċitriku	pK _a (8)	Temp. f°C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Il-prinċipju tal-metodu ta' ttestjar

Il-proċess kimiku deskritt ġeneralment f'it ikun dipendenti mit-temperatura fil-medda ta' temperaturi rilevanti għall-ambjent. Id-determinazzjoni tal-kostant ta' dissoċjazzjoni teħtieġ kejl tal-konċentrazzjonijiet tal-forom dissoċjati u mhux dissoċjati tas-sustanza kimika. Bl-għarfien tal-istekjometrija tar-reazzjoni ta' dissoċjazzjoni indikata fid-Definizzjonijiet u unitajiet, iktar 'il fuq, jista' jiġi stabbilit il-kostant it-tajjeb. Fil-każ partikolari deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, is-sustanza qiegħda ġgħib ruhha bħala aċidu jew bażi, u d-determinazzjoni tista' ssir l-aħjar billi jiġu stabbiliti l-konċentrazzjonijiet rilevanti tal-forom jonizzati u mhux jonizzati tas-sustanza u l-pH tas-soluzzjoni. Ir-relazzjoni bejn dawn it-termini tinghata fl-ekwazzjoni għall-pK_a f'Definizzjonijiet u unitajiet, iktar 'il fuq. Ċerti sustanzi jesibixxu iktar minn kostant ta' dissoċjazzjoni wiehed u jistgħu jiġu żviluppati ekwazzjonijiet simili. Uħud mill-metodi deskritti hawnhekk huma adattati wkoll għal dissoċjazzjoni mhux aċida/baži.

Kriterji tal-kwalità*Ripetibbiltà*

Il-kostant ta' dissoċjazzjoni għandu jiġi rreplikat (tal-inqas tliet determinazzjonijiet) għal unità fi hdan ± 0.1 unità log.

DESKRIZZJONI TAL-PROCEDURI TA' TEST

Hemm zewġ approċċi bażiċi għad-determinazzjoni tal-pK_a. Wiehed jinvolvi titrazzjoni ta' ammont magħruf ta' sustanza b'aċidu jew bażi standard, kif xieraq; l-ieħor jinvolvi l-istabbiliment tal-konċentrazzjoni relattiva tal-forom jonizzati u mhux jonizzati u d-dipendenza tagħha mill-pH.

▼ **M7****Preparamenti**

Il-metodi bbażati fuq dawk il-prinċipji jistgħu jiġu kklassifikati bħala proċeduri ta' titrazzjoni, ta' spettrofotometrija u ta' konduttometrija.

Soluzzjonijiet tat-test

Għall-metodu ta' Winkler u l-metodu konduttometriku, is-sustanza kimika għandha tiġi dissolta f' ilma distillat. Għal metodi spettrofotometriċi u oħrajn, jintużaw soluzzjonijiet mewwieta. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ma għandhiex taqbeż l-inqas wieħed bejn 0.01 M jew nofs il-konċentrazzjoni tas-saturazzjoni, u l-iktar forma pura disponibbli tas-sustanza għandha tintuża fit-tiswir tas-soluzzjonijiet. Jekk is-sustanza jkollha solubilità medja, tista' tiġi dissolta f'ammont żgħir ta' solvent li jithallat mal-ilma qabel ma jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet indikati hawn fuq.

Is-soluzzjonijiet għandhom jiġu vverifikati għall-preżenza ta' emulsjonijiet bl-użu ta' raġġ ta' Tyndall, speċjalment jekk jintuża kosolvent sabiex tissaħħaħ is-solubilità. Meta jintużaw soluzzjonijiet mewwieta, il-konċentrazzjoni tal-bafer ma għandhiex taqbeż iż-0.05 M.

Kundizzjonijiet tat-test*Temperatura*

It-temperatura għandha tiġi kkontrollata sa tal-inqas ± 1 °C. Id-determinazzjoni ideament għandha ssir f'20 °C.

Jekk ikun hemm suspett ta' dipendenza sinifikanti fuq it-temperatura, id-determinazzjoni għandha ssir f'tal-inqas żewġ temperaturi oħrajn. L-intervalli tat-temperatura għandhom ikunu ta' 10 °C f'dan il-każ u l-kontroll tat-temperatura ± 0.1 °C.

Analizzijiet

Il-metodu sejjer jiġi stabbilit mill-ghamla tas-sustanza li tkun qiegħda tiġi ttestjata. Irid ikun sensitiv biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jiġu stabbiliti l-ispeċijiet differenti f'kull konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tat-test.

It-twetliq tat-test*Il-metodu ta' Winkler*

Is-soluzzjoni tat-test tiġi stabbilita b'titrazzjoni bis-soluzzjoni bażi jew aċida standard kif xieraq, billi titkejjel il-pH wara kull żieda ta' soluzzjoni titrata. Għandhom isiru minimu ta' 10 żidiet addizzjonali qabel il-punt ta' ekwivalenza. Jekk l-ekwilibriju jintlaħaq malajr biżżejjed, jista' jintuża potentjometru tar-reġistrazzjoni. Għal dan il-metodu, kemm il-kwantità totali tas-sustanza kif ukoll il-konċentrazzjoni tagħha jridu jkun magħrufin bl-eżatt. Iridu jittiehdu prekawzjonijiet sabiex jiġi eskluż id-diossidu tal-karbonju. Dettalji dwar il-proċedura, il-prekawzjonijiet, u l-kalkolu jingħataw f'testijiet standard, eż. referenzi (1), (2), (3), (4).

Il-metodu spettrofotometriku

Tul tal-mewġa jinstab meta l-forom jonizzati u mhux jonizzati tas-sustanzi jkollhom koefċjenti ta' estinzjoni konsiderevolment differenti. L-ispettru ta' assorbiment tal-UV/VIS jinkiseb minn soluzzjonijiet ta' konċentrazzjoni kostanti taht kundizzjoni tal-pH li fiha s-sustanza essenzjalment ma tkunx jonizzata u kompletament jonizzata u f'bosta pHs intermedji. Dan jista' jsir, jew billi jiżdiedu inkrementi ta' aċidu kkonċentrat (bażi) ma' volum relattivament kbir ta' soluzzjoni tas-sustanza f'bafer b'bosta komponenti, inizjalment f'pH għolja (baxxa) (ref. 5), jew billi jiżdiedu volumi ndaq ta' soluzzjoni ewlenija tas-sustanza, pereżempju fl-ilma, il-metanol, ma' volumi kostanti ta' bosta soluzzjonijiet mewwieta li jkopru l-medda ta' pH mixtieqa. Mill-valuri tal-pH u l-assorbiment fit-tul tal-mewġa magħżula, jiġi kkalkolat numru suffiċjenti ta' valuri għall-pK_a billi tintuża dejta minn tal-inqas 5 pHs meta s-sustanza tkun tal-inqas 10 fil-mija u inqas minn 90 fil-mija jonizzata. Id-dettalji sperimentali ulterjuri u l-metodu ta' kalkolu jingħataw fir-referenza (1).

▼ **M7***Il-metodu konduttometriku*

Bl-użu ta' ċellola ta' kostant żgħir u magħruf taċ-ċellola, titkejjel il-konduttività ta' soluzzjoni ta' madwar 0.1 M tas-sustanza f'ilma tal-konduttività. Jitkejlu wkoll il-konduttivitajiet ta' numru ta' dilwizzjonijiet li jsiru bi preċiżjoni ta' din is-soluzzjoni. Il-konċentrazzjoni titnaqqas bin-nofs kull darba, u s-serje għandha tkopri tal-inqas ordni ta' kobor fil-konċentrazzjoni. Il-konduttività ta' limitazzjoni f'dilwizzjoni infinita tinstab billi jsir esperiment simili b'mel Λ_{∞} u bl-estrapolazzjoni. Imbagħad il-grad ta' dissoċjazzjoni jkun jista' jiġi kkalkolat mill-konduttività ta' kull soluzzjoni bl-użu tal-ekwazzjoni Onsager, u b'hekk bl-użu tal-Liġi ta' Dilwizzjoni Ostwald jista' jiġi kkalkolat il-kostant ta' dissoċjazzjoni bħala $K = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ fejn C hija l-konċentrazzjoni f'moli kull litru u α hija l-frazzjoni dissoċjata. Iridu jittiehdu prekawżjonijiet sabiex jiġi eskluż is- CO_2 . Id-dettalji sperimentali ulterjuri u l-metodu ta' kalkolu jintgħataw fit-testi standard u fir-referenzi (1), (6) u (7).

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati***Il-metodu ta' Winkler*

Il- pK_a hija kkalkolata għal 10 punti mkejlin fuq il-kurva ta' titrazzjoni. Jiġu kkalkolati d-devjazzjoni medja u d-devjazzjoni standard tat-tali valuri pK_a . Plott tal-pH kontra l-volum tal-baži jew l-aċidu standard għandha tkun inkluża flimkien ma' preżentazzjoni f'tabelli.

Il-metodu spettrofotometriku

L-assorbiment u l-pH huma mqegħdin f'tabella minn kull spettru. Tal-inqas hames valuri għall- pK_a huma kkalkolati mill-punti ta' data tal-ispettri intermedji, u jiġu kkalkolati d-devjazzjoni medja u dik standard ta' dawn ir-riżultati wkoll.

Il-metodu konduttometriku

Il-konduttività ekwivalenti Λ hija kkalkolata għal kull konċentrazzjoni tal-aċidu u għal kull konċentrazzjoni ta' tahlita ta' ekwivalenti ta' aċidu, flimkien ma' 0.98 ekwivalenti ta' idrossidu tas-sodju mingħajr karbonat. L-aċidu huwa eċċessiv sabiex jiġi evitat OH^- eċċessiv minhabba l-idrolizi. $1/\Lambda$ tiġi pplotjata kontra Λ_{∞} tal-melħ tista' tinstab bl-estrapolazzjoni għal konċentrazzjoni żero.

Λ_{∞} tal-aċidu tista' tiġi kkalkolata billi jintużaw il-valuri tat-tagħrif għal H^+ u Na^+ . Il- pK_a tista' tiġi kkalkolata minn $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_{\infty}$ u $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ għal kull konċentrazzjoni. Valuri aħjar għall- K_a jistgħu jinkisbu billi jsiru korrezzjonijiet għall-mobilità u l-attività. Għandhom jiġu kkalkolati d-devjazzjoni medja u d-devjazzjoni standard tal-valuri pK_a .

Rapport tat-test

Id-dejta mhux ipproċessata u l-valuri pK_a kkalkolati kollha għandhom jiġu sottomessi flimkien mal-metodu ta' kalkolu (idealment f'forma ta' tabelli, kif issuġġerit fir-ref. 1) u hekk ukoll il-parametri statistiċi deskritti iktar 'il fuq. Għall-metodi ta' Winkler, għandhom jingħataw id-dettalji tal-istandardizzazzjoni tas-soluzzjonijiet titrati.

Għall-metodu spettrofotometriku, għandhom jiġu sottomessi l-ispettri kollha. Għall-metodu konduttometriku, għandhom jiġu rrapportati d-dettalji tad-determinazzjoni tal-kostant taċ-ċelloli. Għandha tingħata informazzjoni dwar it-teknika użata, il-metodi analitiċi u l-għamla ta' kwalunkwe bafer użat.

Għandha tiġi rrapportata t-temperatura (jew temperaturi) tat-test.

TAGHRIF

- (1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.

▼M7

- (2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, pp. 1186-1188 (1969).
- (3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
- (5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (March 1973).
- (6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- (7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (see above (4)).
- (8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B**PARTI B: METODI GHAD-DETERMINAZZJONI TAT-TOSSICITÀ U EFFETTI OHRA TAS-SAHHA****WERREJ****DAHLA ĠENERALI**

- B.1.bis. TOSSICITÀ ORALI AKUTA – PROĊEDURA GHAL DOŻA FISSA
- B.1.tris. TOSSICITÀ ORALI AKUTA – METODU TAL-KLASSIFIKA TOSSIKA AKUTA
- B.2. TOSSICITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA
- B.3. TOSSICITÀ AKUTA (DERMALI)
- B.4. TOSSICITÀ AKUTA: IRRITAZZJONI/KORRUŻJONI TAL-ĠILDA
- B.5. IRRITAZZJONI AKUTA TAL-GHAJNEJN/KORRUŻJONI
- B.6. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA
- B.7. STUDJU DWAR IT-TOSSICITÀ ORALI TA' DOŻA RIPETUTA KULL 28 JUM FIR-RODITURI
- B.8. TOSSICITÀ TA' INALAZZJONI SUBAKUTA: STUDJU TA' 28 JUM
- B.9. DOŻI REPETUTI (28 jum) TOSSICITÀ (DERMALI)
- B.10. TEST *IN VITRO* TA' ABERRAZZJONI KROMOŽOMIKA FIL-MAMMIFERI
- B.11. TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŽOMI TAL-MUDULLUN TAL-MAMMIFERI
- B.12. TEST TAL-MIKRONUKLEU FL-ERITROĊITI MAMMIFERI
- B.13/14. MUTAĠENIĊITÀ – TEST TA' MUTAZZJONI RIVERSIVA TA' BATTERJI
- B.17. MUTAĠENEĊITÀ – TEST TAL-MUTAZZJONI TAL-ĠENE TAĊ-CELLULA TAL-MAMMIFERI *IN VITRO*
- B.21. TEST TAT-TIBDIL TAL-ĠENI F'CELLULI MAMMIFERI *IN VITRO*
- B.22. TEST LETALI DOMINANTI TAL-MAMMALI ĠERRIERA

▼B

- B.23. TEST DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŽOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI
- B.25. IT-TRASLOKAZZJONI TAL-ĠRIEDEN LI TITTIEHED
- B.26. EŻAMI TA' TOSSICITÀ ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻA GHAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊJI TA' ANIMALI GERRIEMA
- B.27. EŻAMI TA' TOSSICITÀ ORALI SUB-KRONIKU ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI RIPETUTA TA' DOŻI GHAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA' SPEĊI TA' ANIMALI MHUX GERRIEMA
- B.28. STUDJU TAT-TOSSICITÀ DERMALI SUB-KRONIKA STUDJU DERMALI TAD- DOŻA RIPETUT GHAL 90 ĠURNATA LI JUŻA SPEĊI TA' MAMMALI GERRIEMA
- B.29. TOSSICITÀ TA' INALAZZJONI SUBKRONIKA: STUDJU TA' 90 JUM
- B.30. STUDJI DWAR TOSSICITÀ KRONIKA
- B.31. STUDJU TAT-TOSSICITÀ FL-IŻVILUPP PRENATALI
- B.32. STUDJI DWAR IL-KARĊINOGENIČITÀ
- B.33. STUDJI KONGUNTI DWAR TOSSICITÀ KRONIKA/KARĊINOGENIČITÀ
- B.34. TEST TA' TOSSICITÀ FUQ IR-RIPRODUZZJONI FUQ ĠENERAZZJONI WAHDA
- B.35. STUDJU TAT-TOSSICITÀ REPRODUTTIVA FUQ ŻEWĠ ĠENERAZZJONIJIET
- B.36. TOSSIKOKINETIČI
- B.37. ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSICITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* WARA L-ESPOŻIZZJONI AKUTA
- B.38. ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSICITÀ TAS-SUSTANZI *ORGANOPHOSPHORUS* STUDJU TA' DOŻA RIPETUTTA GHAL 28 ĠURNATA
- B.39. TEST *IN VIVO* TA' SINTESI MHUX PROGRAMMATA TA' DNA (UDS) FUQ ĊELLULI TAL-FWIED TAL-MAMMIFERI
- B.40. IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER – TRANSCUTANEAL ELECTRICAL RESISTANCE)
- B.40.BIS. IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAL-MUDELL TAL-ĠILDA UMANA
- B.41. IT-TEST TAL-FOTOTOSSICITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU
- B.42. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULA TAL-LIMFA LOKALI

▼B

- B.43. STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSICITÀ FL-ANIMALI GERRIEMA
- B.44. L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VIVO*
- B.45. L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VITRO*
- B.46. IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIDE UMANA RIKOSTRUWITA
- B.47. METODU TAT-TEST TAL-OPAĊITÀ U L-PERMEABILITÀ TAL-KORNEA FIL-BOVINI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' I) SUSTANZI KIMIČI LI JINDUČU HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIČI LI MA JEHTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GHAL IRRITAZZJONI TAL-GHAJNEJN JEW HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN
- B.48. METODU TA' TTESTJAR TAL-GHAJNEJN TAT-TIĠIEĠ IŻOLATI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' I) SUSTANZI KIMIČI LI JINDUČU HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIČI LI MA JEHTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GHAL IRRITAZZJONI TAL-GHAJNEJN JEW HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN
- B.49. TEST *IN VITRO* TAL-MIKRONUKLEU TAČ-ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI
- B.50. TEST *IN VITRO* TAL-MIKRONUKLEU TAČ-ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI
- B.51. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŽI TAN-NODULU LIMFATIKU LOKALI BRDU-ELISA
- B.52. TOSSICITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA – METODU TA' KLASSI AKUTA TOSSIKA
- B.53. STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSICITÀ TAL-IŻVILUPP
- B.54. BIJOASSAĠĠ UTEROTROFIKU F'RODITURI: TEST TA' TGHARBIL TA' TERMINU QASIR GHAL PROPRJETAJIET ESTROĠENIČI
- B.55. BIJOASSAĠĠ HERSHBERGER F'FIRIEN: ASSAĠĠ TA' TGHARBIL TA' TERMINU QASIR GHAL PROPRJETAJIET (ANTI)ANDROĠENIČI
- B.56. STUDJU ESTIŽ TAT-TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA TA' ĠENERAZZJONI WAHDA
- B.57. H295R ASSAĠĠ TAL-ISTEROJDOĠENESI
- B.58. ASSAĠĠ TAL-MUTAZZJONI TAL-ĠENI SOMATIČI U TAČ-ĊELLOLI TAL-ĠERMI TA' RODITURI TRANSĠENIČI
- B.59. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA IN CHEMICO: ASSAĠĠ DIRETT TAR-REATTIVITÀ TAL-PEPTIDI (DPRA)
- B.60. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA IN VITRO: METODU TA' TTESTJAR TAL-ARE-NRF2 LUCIFERASE
- B.61. METODU TA' TTESTJAR TAT-TNIXXIJA TA' FLUWOREX-XEINA GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' KORRUŽIVI OKULARI U IRRITANTI SEVERI
- B.62. ASSAĠĠ *IN VIVO* KOMETA TAL-ALKALINI TAL-MAMMIFERI



DAHLA ĠENERALI

A. KARATTERIZZAZZJONI TAS-SUSTANZA GHAT-TEST

Il-kompożizzjoni tas-sustanza għat-test, inklużi l-impuritajiet l-iktar importanti, u l-proprietajiet fiżiko-kimiċi rilevanti tagħha inklużi l-istabilità, għandha tkun magħrufa qabel il-bidu ta' kwalunkwe studju għat-tossicità.

Il-proprietajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza għat-test jagħtu informazzjoni importanti fl-għażla election of the route of administration, the design of each particular study and the handling and storage of the test substance.

L-iżvilupp ta' metodu analitiku għad-determinazzjoni tas-sustanza għat-test (inklużi l-impuritajiet prinċipali meta hu possibbli) fil-midjum tad-dożagġ u l-materjal bijoloġiku għandu jiġi qabel il-bidu ta' l-istudju.

L-informazzjoni kollha li għandha x'taqsam ma' l-identifikazzjoni, il-proprietajiet fiżiko-kimiċi, il-purità, u l-imġiba tas-sustanza għat-test għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

B. KURA TA' L-ANIMALI

Il-kontroll strett tal-kundizzjonijiet ambjentali u l-kura b'sengha ta' l-annimali huma essenzjali fl-ittestjar tat-tossicità

(i) *Il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew l-annimali*

Il-kundizzjonijiet ambjentali fil-kmamar sperimentali jew l-ispazji magħluqa ta' l-annimali għandhom ikunu xierqa għall-ispeċi li se jiġu ttestjati. Għall-firien, ġrieden u fniek ta' l-indi, il-kundizzjonijiet xierqa huma temperatura tal-kamra ta' $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ b'umdità relattiva minn 30 sa 70 %; għall-fniek it-temperatura għandha tkun ta' $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ b'umdità relattiva minn 30 sa 70 %.

Certi tekniki sperimentali huma partikularment sensitivi għall-effetti tat-temperatura u, f'dawn il-każijiet, id-dettalji tal-kundizzjonijiet xierqa huma inklużi fid-deskrizzjoni tal-metodu tat-test. Fl-investigazzjonijiet kollha ta' l-effetti tossiċi, it-temperatura u l-umdità għandhom jiġu mmoniterjati, irrekordjati, u inklużi fir-rapport finali ta' l-istudju.

Id-dwal għandhom ikunu artifiċjali, is-sekwenza għandha tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Id-dettalji tas-sekwenza tad-dwal għandhom jiġu rrekordjati u inklużi fir-rapport finali ta' l-istudju.

Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor fil-metodu, l-annimali jistgħu jitpoġġew individwalment, jew jinqafu fi gruppi żgħar ta' l-istess sess; biex jinqafu fi grupp, m'għandux ikun hemm iktar minn hames annimali f'kull gaġġa.

Fir-rapporti ta' l-esperimenti fuq l-annimali, huwa importanti li jidher ċar kif qed jiġu maqfula l-annimali u n-numru ta' annimali mpogġija f'kull gaġġa kemm waqt l-espożizzjoni għall-kimika u kemm waqt kwalunkwe perjodu ta' osservazzjoni li jiġi wara.

▼B

(ii) *Kundizzjonijiet ta' l-għalf*

Id-dieti għandhom jissodisfaw il-htigiet nutrizzjonali kollha ta' l-ispeċi li qed jiġu ttestjati. Fejn jiġu amministrati s-sustanzi għat-test fid-dieta ta' l-annimali il-valur nutrizzjonali jista' jonqos permezz ta' l-effett li s-sustanza u l-kostitwent tad-dieta jagħmlu fuq xulxin. Il-possibbiltà ta' reazzjoni bħal din għandha tiġi meqjusa meta jiġu interpretati ir-riżultati tat-testijiet. Id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu jintużaw b'forniment illimitat ta' ilma għax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mil-htieġa li tiġi żgurata tahlita xierqa tas-sustanza għat-test meta tiġi somministrata b'dan il-metodu.

Il-kontaminanti tad-dieta li jinfluwenzaw it-tossicità m'għandhomx ikunu preżenti f'koncentrazzjonijiet li jinterferixxu.

C. **ITTESTJAR ALTERNATTIV**

L-Unjoni Ewropea għandha l-impenn li tippromwovi l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' tekniki alternattivi li jistgħu jipprovdu l-istess livell ta' informazzjoni bħala testijiet kurrenti għall-annimali, iżda li jużaw inqas annimali, jikkawżaw inqas tbatija jew jevitaw kompletament l-użu ta' annimali.

Metodi bħal dawn, meta jsiru disponibbli, għandhom jiġu kkunsidrati fejn hu possibbli għall-karatterizzazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni u l-ittikettjar konsegwenti għall-perikli intrinziċi u l-valutazzjoni għas-sigurtà tal-kimika.

D. **EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI**

Meta t-testijiet jiġu evalwati u interpretati, il-limitazzjonijiet safejn ir-riżultati ta' l-istudji ta' l-annimali u ta' l-in *vitro* jistgħu jkunu estrapolati direttament lill-bniedem iridu jiġu kkunsidrati u għalhekk, l-evidenza ta' effetti avversi fil-bnedmin, fejn huma disponibbli, jistgħu jintużaw għall-konfermazzjoni tar-riżultati ta' l-ittestjar.

E. **REFERENZI TA' LETTERATURA**

Bosta minn dawn il-metodi huma żviluppati fi hdan l-istruttura tal-programm OECD *Testing Guidelines*, u għandhom isiru skond il-prinċipji tal-*Good Laboratory Practice*, sabiex jiżguraw 'l-aċċettazzjoni reċiproka tad-data' kemm jista' jkun.

Informazzjoni addizzjonali tinsab fir-referenzi msemmija fil-linji gwida ta' l-OECD u l-letteratura relevanti ppubblikata x'imkien ieħor.

▼B**B.1 BIS. TOSSICITÀ ORALI AKUTA – PROCEDURA GHAL DOŻA FISSA****1. METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalenti ghal OECD TG 420 (2001)

1.1. DAHLA

Il-metodi tradizzjonali għall-istudju tat-tossicità akuta bl-użu tal-mewt ta' l-annimali bħala l-għan ewlieni. Fil-1984, resqien ġdid dwar it-testijiet tat-tossicità akuta kien ġie sugġerit mill-British Toxicology Society li huwa ibbażat fuq l-amministrazzjoni f'serje ta' livelli ta' doži fissi (1). Ir-resqien evita l-użu tal-mewt ta' l-annimali bħala l-għan ewlieni, u minflok strah fuq l-osservazzjonijiet ta' sinjali ċari tat-tossicità f'wieħed mis-serje ta' livelli ta' doži fissi. Bsegwiment ta' studji *in vivo* tal-validazzjoni fil-UK (2) u f'medda internazzjonali (3), il-proċedura kienet adottata bħala metodu tat-test fil-1992. Sussegwentament, il-propjetajiet statistiċi tal-Proċedura ta' Doża Fissa kienu ġew evalwati bl-użu ta' mudelli matematiċi f'serje ta' studji (4) (5) (6). Flimkien, l-istudji *in vivo* u l-mudellar kienu were li l-proċedura hija riproduttibbli, bl-użu anqas ta' annimali u tikkawża anqas tbaġhtija mill-metodi tradizzjonali u hija kapaci li tiggrada s-sustanzi f'manjera simili mal-metodi l-oħrajn tat-testijiet tat-tossicità akuta.

Gwida dwar l-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq ghal skop partikolari tista' tinstab fid-Dokument ta' Gwida dwar it-Testijiet tat-Tossicità Akuta Orali (7). Dan id-Dokument ta' Gwida fih ukoll informazzjoni addizzjonali dwar it-twettieq u l-interpretazzjoni tal-Metodu tat-test B.1 bis.

Huwa prinċipju tal-metodu li fl-istudju ewlieni doži tossiċi moderati biss ikunu użati, u li l-amministrazzjoni tad-doži li jkunu mistenna bħala letali għandhom ikunu evitati. Ukoll, id-doži li huma magħrufa bħala li jikkawżaw uġieġ u tqallib żejjed, minhabba l-azzjonijiet korrossivi jew ta' irritazzjoni qawwija, ma jkunx hemm hteġa li jkunu amministrati. Annimali moridondi, jew annimali li ovvjament ikunu bl-uġieġ jew li juru sinjali ta' tqallib sever u dewwiemi għandhom ikunu maqtula b'mod uman, u huma meqjusa fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mezz bħal dawk l-annimali li jkunu mietu waqt it-test. Il-kriterja ta' kif tittiehed id-deċiżjoni sabiex ikunu maqtula l-annimali moribondi jew dawk li jkunu fi tbaġhtija kbira, u l-gwida għar-rikonoxximent ta' mewt prevista jew mistennija, huma s-sugġett ta' Dokument ta' Gwida separat (8).

Il-metodu jipprovdi informazzjoni dwar il-propjetajiet perikolużi u jippermetti li s-sustanza tkun iggradata u ikklassifikata skond il-Globally Harmonised System (GHS) (Sistema Armonizzata Globali) għall-klassifika ta' kimika li tohloq tossicità akuta (9).

Il-laboratorju tat-test għandu jikkonsidra l-informazzjoni disponibbli kollha dwar is-sustanza tat-test qabel ma jwettaq l-istudju. Tali informazzjoni għandha tinkludi l-identifikaazzjoni u l-istruttura kimika tas-sustanza; il-propjetajiet fizikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' xi testijiet oħrajn *In vitro* jew *in vivo* dwar is-sustanza' id-dettalji tossikoloġiċi dwar sustanzi strutturalment relatati; u l-użu(i) antiċipati tas-sustanza. Din l-informazzjoni hija meħtieġa sabiex tissodisfa lil dawk kollha ikkonċernati li t-test huwa rilevanti għall-protezzjoni tas-saħha umana, u li jkun jgħin fil-għażla ta' doża xierqa ghal-bidu.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità akuta orali: Tirreferi għall-effetti ħżiena li jseħhu wara l-amministrazzjoni orali ta' doża wahda ta' sustanza jew dozi multipli, matul 24 siegħa.

Mewt imdewma: Tfiſser li l-annimal ma jkunx u ma jidherx moribond fi żmien 48 siegħa, imma li jmut aktar tard matul il-perjodu ta' osservazzjoni ta' 14-il jum.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test li tkun somministrata. Id-doża hija espressa bħala l-piż tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (eż. mg/kg).

Tossiċità evidenti: Hija terminologija ġenerali li tiddekrivi sinjali ċari tat-tossiċità bħala segwiment ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test (ara (3) għall-eżempji) bħal ma hija d-doża fissa segwenti aktar għolja li tohloq uġiegh waqqi jew sinjali dewwiema ta' tbaġtija qawwija, l-istatus ta' moribond (il-kriterja hija ippreżentatha fil-Humane Endpoints Guidance Document (8) (Dokument ta' Gwida dwar l-Għanijiet Umani)), jew li l-probabbiltà ta' mortalità f'bosta annimali tista' tkun mistennija.

GHS: *Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*. (Sistema tal-Klassifikazzjoni Armonizzata Globali dwar Sustanzi u Taħlitiet Kimiċi.) Attività kongunta tal-OECD (is-saħħa umana u l-ambjent), il-Kumitat tan-NU ta' l-Esperti dwar it-Trasport ta' Ogġetti Perikolużi (il-propjetajiet fiżiċi/kimiċi) u l-ILO (kommunikazzjoni ta' periklu) u kordinata mill-Programm Interorganizzazzjonali għal Amministrazzjoni Soda tal-Kimika (IOMC).

Mewt iminenti: Meta l-istat ta' moribond jew mewt ikun mistenni qabel il-hin ta' l-osservazzjoni segwenti ippjanata. Sinjali indikattivi ta' dan l-istat f'annimali gerriema jistgħu jinkludu konvulżjonijiet, posizzjoni laterali, mimduda, u roda. (Ara d-Dokument ta' Gwida dwar l-Umanita Immirata (8) għal aktar dettalji).

LD₅₀ (doża letali medja): Hija akkwistata b'mod statistiku minn doża wahda ta' sustanza li tista' tkun mistennija li tikkaġuna mewt f'50 fil-mija ta' l-annimali meta amministrati permezz tar-rotta orali. Il-valur LD₅₀ huwa espress f'termini ta' piż tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal tat-test (mg/kg).

Limitu tad-doża: Tirreferi għal doża fil-litu l-aktar għoli tagħha waqt it-testijiet (2 000 jew 5 000 mg/kg).

L-istat moribondi: Huwa l-istat ta' qabel il-mewt jew ta' l-inabbiltà tas-sopravivenza, anki jekk ikun hemm trattament. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (8) dwar aktar dettalji).

Mewt mistennija: Il-preżenza ta' sinjali kliniċi indikattivi tal-mewt fi żmien mistenni jew inkella fil-ġejjieni imma qabel it-tmiem ippjanat ta' l-esperiment, per eżempju: l-inabbiltà li jersaq lejn l-ilma u lejn l-ikel. (Ara d-Dokmunet ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (8) dwar aktar dettalji).

▼B**1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST**

Gruppi ta' annimali ta' sess wiehed huma mogħtija doża fi proċedura mtarraġa bl-użu ta' dozi fissi ta' 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg (eċċezzjonalment għal doża fissa addizzjonali ta' 5 000 mg/kg li tista' tkun ikkunsidrata, ara s-sezzjoni 1.6.2.). Il-livell inizjali tad-doża huwa magħżul fuq il-bażi ta' l-istudju tas-sejbien bhala d-doża mistennija li tipproduċi xi sinjali ta' tossiċità mingħajr ma tohloq l-effetti ta' tossiċità severa jew tal-mortalità. Is-sinjali kliniċi u l-kundizzjonijiet assoċjati ma l-uġiegh, sofferenza, u mewt iminenti, huma deskritti fid-dettall fi Gwida OECD separata, id-Dokument (8). L-annimali jistgħu jingħataw doża aktar għolja jew aktar baxxa, jiddependi mill-preżenza jew in-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità jew mortalità. Din il-proċedura tinzamm sakemm id-doża li tohloq tossiċità evidenti jew ta' mewt wahda jew aktar, ikunu identifikati, jew meta l-ebda effetti ma jkunu jidhru fid-doża l-aktar għolja jew meta l-imwiet isehhu fid-doża l-aktar baxxa.

1.4. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**1.4.1. L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċi preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċi oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Normalment ikunu wżata il-femminili (7). Dan huwa minhabba li listharrig letterarju tat-testijiet konvenzjonali LD₅₀ juru li normalment ikun hemm ftit differenza fis-sensittività bejn is-sessi, imma li f'dawk il-kazi meta d-differenzi jkunu osservati, in-nisa ikunu generalment kemm xejn aktar sensittivi (10). B'dana kollu, jekk tagħrif dwar il-propjetajiet tossikoloġiċi jew tossikinetiċi ta' kimiċi strutturament relatati jindika li l-irġiel aktarx li jkunu aktar sensittivi, allura dak is-sess għandu jkun użat. Meta t-test ikun imwettaq fuq maskili, ġustifikazzjoni adegwata għandha tkun ipprovduta.

Annimali żgħażaġh adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Kull animal, fil-bidu ta' meta jkun sejjer jingħata doża, għandu jkun f'età ta' bejn 8 u 12 il-ġimgħa u l-piż tiegħu għandu jkun fil-medda ta' $\pm 20\%$ tal-piż medju ta' dawk l-annimali li preċedament ikun u ntuzaw għad-dożi.

1.4.2. Il-kundizzjonijiet tal-gaġġ u ta' l-għalf

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-annimali jistgħu ikunu miġbura flimkien bhala grupp skond id-doża, imma n-numru ta' l-annimali f'kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjonijiet ċari ta' kull animal.

1.4.3. Preparazzjoni ta' l-annimali

L-animmali għandhom ikunu magħżula kif jinzerta, immarkati sabiex jippermettu identifikazzjoni individwali, u miżmuma fil-gaġġ tagħhom għal mill-anqas 5 tjiem qabel il-bidu tad-dożi sabiex jippermettu li jkunu akklamattizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

▼B

1.4.4. **Preparazzjoni tad-doži**

Generalment, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu amministrati f'volum kostanti matul medda ta' doži tat-testijiet bil-varjazzjoni tal-koncentrazzjoni fil-preparazzjoni tad-doži. Meta, b'dana kollu, likwidu jew tahlita ikunu l-prodott finali, l-użu ta' sustanza tat-test minghajr trattib, i.e. konċentrazzjoni kostanti, tista' tkun aktar relevanti għall-istudju sussegwenti tar-riskju ta' dik is-sustanza, u hija hteġa għal uħud mill-awtoritajiet regolatorji. Fi kwalunkwe każ, il-volum massimu tad-doża għall-amministrazzjoni m'għandux ikunu misbuq. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wiehed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-animall tat-test. Fl-animalli gerriema, il-volum m'għandux normalment jeċċedi 1ml/100g tal-piż tal-ġisem: b'dana kollu fil-każ ta' tahlitiet akweji, 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkunsidrat. Fir- rigward tal-formulazzjoni tal-preparazzjoni tad-doża, l-użu ta' tahlita/sospensjoni/emulsifikazzjoni akweja hija rakkommandata kull meta possibbli, segwita f'ordni ta' preferenza bit-tahlita/sospensjoni/emulsifikazzjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħ-ir- rum) u mbagħad il-possibbiltà ta' likwidi oħrajn. Għal likwidi oħrajn appartati milli l-ilma, il- karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. Id-doži għandhom ikunu ippreparati ftit qabel l-amministrazzjoni, sakemm l-istabbiltà tal-preparazzjoni matul il- perjodu ta' l-użu tkun magħruha u turi li tkun aċċettabbli.

1.5. **PROCEDURA**1.5.1. **Amministrazzjoni tad-doži**

Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doża waħda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi intubazzjoni canula xierqa. F'ċirkostanzi mhux tas-soltu li fihom doża waħda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

L-animalli għandhom ikunu msajma qabel ma jingħataw id-doża (eż. għall-firien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul il-lejl sal-hin ta' l-esperiment; fil-każ ta' ġurdien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul 3-4 siegħat). Wara l-perjodu tas-sawma, l-animalli għandhom ikunu miżuna u s-sustanza tat-test tkun somministrata. Wara li s-sustanza tat-test tkun somministrata, l-ikel jista' jkun imċaħħad għal 3-4 siegħat oħra fil-każ tal-firien jew 1-2 siegħat fil-każ tal-ġurdien. Meta d-doża tkun somministrata fi frazzjonijiet matul perjodu ta' żmien, jista' jkun meħtieġ li l-animalli jkunoprovduti b'ikel u ilma, jiddependi mit-tul tal-perjodu.

1.5.2. **Studju ta' l-osservazzjoni**

L-iskop ta' l-istudju ta' l-osservazzjoni huwa li jippermetti l-għażla xierqa tad-doża tal-bidu li tintuża fl-istudju ewlieni. Is-sustanza tat-test hija somministrata lill-animalli singoli b'manjera sekwenzali skond il-karti tan-nixxija fl-Anness 1. L-istudju ta' l-osservazzjoni ikunu komplut meta d-deċizzjoni dwar il-bidu tad-doża għall-istudju ewlieni tkun tista' tittiehed (jew jekk il-mewt tkun apparenti fid-doża l-baxxa kif stabbilita).

Id-doża tal-bidu għall-istudju ta' l-osservazzjoni hija magħżulha minn livelli fissi ta' doži ta' 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg bħala doża mistennija li tipproduċi tossiċità evidenti ibbażata, meta possibbli, fuq evidenza mid-dettalji *In vivo* u *In vitro* mill-istess kimika jew il-kimiċi ta' struttura relatata. Fin-nuqqas ta' tali informazzjoni, id-doża tal-bidu għandha tkun 3000 mg/kg.

Perijodu ta' mill-anqas 24 siegħa għandu jkun imħolli bejn l-ghoti tad-doża lil kull animall. L-animalli kollha għandhom ikunu osservati għal mil anqas 14-il jum.

▼B

B'mod eċċezzjonali, u biss meta iġġustifikat bi htigiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali iffissata fil-livell għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkonsiderata (ara l-Anness 3). Għal raġunijiet li jikkonċernaw il-ġid ta' l-annimali, it-testijiet ta' l-annimali skond GHS, il-Kategorija 5, il-meded (2 000-5 000 mg/kg huma ferm skorraġiti u għandhom biss ikunu ikkonsiderati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu relevanza diretta għall-rotezzjoni umana jew tas-saħħa ta' l-annimali jew dik ambjentali.

Fil-każi meta annimal ikun ittestjat fil-livell l-aktar baxx ta' doża fissa (5 mg/kg) fl-istudju ta' l-osservazzjoni imut, il-proċedura normali hija li jkun terminat l-istudju u li s-sustanza tkun assanjata għal-GHS, Kategorija 1 (kif muri fl-Anness 1). B'dana kollu, jekk aktar konferma tal-klassifika tkun mehtieġa, proċedura supplementari voluntarja tista' tkun imwettqa, kif ġej: It-tieni annimal ikunu mogħti d-doża f'5 mg/kg. Jekk dan it-tieni annimal imut, allura il-Kategorija 1 GHS tkun ikkonfermata u l-istudju jkun terminat immedjetament. Jekk it-tieni annimali jibqa' haj, allura massimu ta' tlett annimali addizzjonali ikunu mogħti d-doża ta' 5 mg/kg. Minhabba li jkun hemm riskju kbir ta' mortalità, dawn l-annimali għandhom ikunu mogħtijja d-doża b'mod sekwenzali sabiex ikun imħares il-ġid ta' l-annimali. Fl-intervall ta' hin bejn kull doża għal kull annimal għandu jkun sufficjenti sabiex ikun stabbilit jekk l-annimal preċedenti jkunx sejjer jibqa' haj. Jekk issehh it-tieni mewt, is-sekwenza tad-doża għandha tkun terminata immedjetament u l-ebda annimali oħrajn ma jingħataw id-doża. Minhabba l-okkorrenza tat-tieni mewt (irrispettivament min-numru ta' l-annimali ittestjati fil-waqt tat-terminazzjoni) tidhol fl-eżitu A (2 jew aktar imwiet), ir-regola tal-klassifika ta' l-Anness 2 fi 5 mg/kg doża fissa tkun segwita (il-Kategorija 1 jew ikun hemm 2 jew aktar imwiet, jew il-Kategorija 2 jekk ikun hemm mhux aktar minn mewt waħda). B'zieda, l-Anness 4 jagħti gwida dwar il-klassifika fis-sistema UE sakemm GHS għida tkun implementata.

1.5.3. Studju ewlieni

1.5.3.1. *Numru ta' l-annimali u l-livelli tad-doži*

L-azzjoni li għandha tittiehed b'segwiment tat-testijiet fid-doża tal-livell tal-bidu hija indikata fil-karti nixxija fl-Anness 2. Waħda mit-tlett azzjonijiet tkun mehtieġa; jew li jieqfu t-testijiet u li tkun assenjata l-klassifikazzjoni tal-klassi tal-periklu xierqa, it-test f'doża ta' livell għola jew test f'doża fl-livell aktar baxx. B'dana kollu, għall-protezzjoni ta' l-annimali, livell ta' doża li jikkaġuna l-mewt fl-istudju ta' l-osservazzjoni m'għandhiex tkun użata mill-ġdid fl-istudju ewlieni (ara l-Anness 2). L-esperjenza wriet li r-riżultat probabbli fil-livell tad-doża tal-bidu ikun dak li s-sustanza tista' tkun klassifikata u li l-ebda aktar testijiet ma jkunu mehtieġa.

Total ta' hames annimali ta' sess wiehes ikun normalment użat għal kull livell ta' doża investigata. Il-hames annimali għandhom ikunu magħmula minn annimal wiehed mill-istudju ta' l-osservazzjoni li jkun ha doża fil-livell magħżul flimkien ma erba annimali addizzjonali oħrajn (apparti, haġa mhux tas-soltu, jekk il-livell tad-doża użat ma kienx inkluz fl-istudju ta' l-osservazzjoni).

L-intervall tal-hin bejn id-doži f'kull wiehed mill-livelli huwa determinat bl-iskoppjar, it-tul, u s-severità, tas-sinjali tossiċi. It-trattament ta' l-annimali fid-doża segwenti għandu jkun imdewwem sakemm wiehed ikun żgur bis-sopravivenza ta' l-annimali li jkunu ireċewew id-doża preċedentament. Perijodu ta' minn 3 sa 4 ijiem bejn id-doži f'kull livell huma rakkommandabbli, jekk mahtieġ, sabiex jippermetti għall-osservazzjoni tat-tossiċità mdewma. L-intervall tal-hin jista' jkun aġġustat kif xieraq, eż. fil-każ ta' reazzjoni mhux konklussiva.

▼B

Meta l-użu tad-doża l-aktar għolja ta' 5 000 mg/kg ikun ikkonsidrat, il-proċedura kif elenkata fl-Appendiċi 3 għandha tkun segwita (ara wkoll is-sezzjoni 1.6.2.).

1.5.3.2. *Test tal-limitu*

It-test tal-limitu huwa primarjament użat f'sitwazzjonijiet meta dak li jwettaq l-esperiment ikollu informazzjoni li tindika li l-materjal tat-test ma jkunx tossiku, i.e. li jkollu tossiċità biss aktar mil-limitu regolatorju tad-doża. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-materjal tat-test tista' tkun akkwistat mit-tagħrif dwar komposti simili li kienu ġew ittestjati jew minn tahlitiet jew prodotti simili li kienu ġew ittestjati, billi tkun meġjusa l-identità u l-persentaġġ tal-komponenti magħrufa li huma ta' sinifikanza tossikoloġika. F'dawk is-sitwazzjonijiet meta f'it jew l-ebda informazzjoni ma tkun disponibbli dwar it-tossiċità tagħha, jew meta l-materjal tat-test ikun mistenni li huwa tossiku, it-test ewlieni għandu jkun imwettaq.

Bl-użu tal-proċedura normali, studju ta' l-osservazzjoni li jibda b'doża ta' 2 000 mg/kg (jew b'mod eċċezzjonali 5 000 mg/kg) segwit b'doża fuq erba' annimali oħrajn f'dan il-livell iservi bħala test tal-limitu għal din il-linja ta' gwida.

1.6. OSSERVAZZJONIJIET

L-annimali osservati individwalment wara l-ewwel doża mill-anqas darba matul l-ewwel 30 minuta, peridodikament matul l-ewwel 24 siegħa, b'attenzjoni speċjali mogħtija matul l-ewwel 4 siegħat, u ta' kull minn hemm il-quddiem, għal total ta' 14-il jum, apparti minn meta jkun meħtieġ li dawn jitmeħħew mill-istudju u li jkunu maqtula b'mod umanesk għal raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali jew inkella li jinsabu mejta. B'dana kollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandhux ikun iffissat b'mod rigoruż. Għandu jkun determinat bir-reazzjoni tossika, il-hin ta' l-iskoppjar u t-tul tal-perjodu ta' l-irkupru, u jista' b'hekk ikun estiż meta ikkonsidrat bħala meħtieġ. Il-hinijiet ta' meta jidhru jew jisparixxu s-sinjali tat-tossiċità huma importanti, speċjalment jekk ikun hemm tendenza li s-sinjali tossiċi jkunu mdewwma (11). L-osservazzjonijiet kollha huma sistematista'ment irreġistrati, b'dettalji individwali jkunu jinżammu għal kull animal.

Osservazzjonijiet addizzjonali jkunu meħtieġa jekk l-annimali jkomplu juru sinjali ta' tossiċità. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu xi tibdil fil-ġilda u s-suf, l-ghajnejn, fil-membrani mukaneji, u wkoll fis-sistemi respiratorji, ċirkulatorji, awtonomiċi u tan-nervituri ċentrali, u l-attività somatomuturali u t-tip ta' l-imġieba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' roda, konvulzjonijiet, rieg, dijarrea, letarġija, irqad u koma. Il-prinċipji u l-kriterja kif aggruppati fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Miri Umanitarji għandhom ikunu ikkonsidrati (8). L-annimali misjuba f'kundizzjoni moribonda u l-annimali li juru sinjali ta' uġieħ qawwi jew li jgħaddu minn sinjali ta' tbgħatija, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju. Meta l-annimali jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji jew jekk jinstabu mejta, il-hin tal-mewt għandu jkun reġistrat bi preċiżjoni kemm jista' jkun possibbli.

1.6.1. **Piż tal-Ġisem**

Il-piżijiet ta' l-annimali individwali għandhom ikunu determinati kemxejn qabel ma s-sustanza tat-test tkun somministrata u mill-anqas darba fil-ġimgha wara dan. Tibdiliet fil-piż għandhom ikunu ikkalkolati u rreġistrati. Fit-tmiem tat-test, l-annimali li jibqgħu haġġin għandhom ikunu miżuna w imbagħas maqtula b'mod umanitarju.

▼B**1.6.2. Patoloġija**

L-annimali kollha tat-test (inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jkunu mneħħija mill-istudju minhabba raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali) għandhom ikunu suġġetti għal nekropsija ġenerali. It-tibdiliet patoloġiċi ġenerali għandhom ikunu irreġistrati għal kull annimal. Ezaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi li juri evidenza patoloġika ġenerali fl-annimali li jibqgħu hajjin għa 24 siegħa jew aktar wara li jkunu rċevew id-doża inizjali għandha wkoll tkun ikkunsidrata minhabba li din tista' tforni informazzjoni utili.

2. DATA

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'zieda ma dan, id-dettalji kollha għandhom ikunu miġbura f'sommarju, li juru għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali użati, in-numru ta' annimali ji jkollhom sinjali ta' tossiċità, in-numru ta' annimali li jins-tabu mejta matul it-test jew li jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-hin tal-mewt ta' l-annimali individwali, deskrizzjoni u l-korsa tal-hin ta' l-effetti tossiċi, u r-riversabbiltà ta' dawn, u s-sejbiet tan-nekropsija.

3. RAPPORTAĠĠ**3.1. RAPPORT TAT-TEST**

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skond kif xieraq:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fizika, il-purità, u meta rilevanti, il-propjetajiet fiziko-kimiċi (inkluża l-izomerizzazzjoni);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni, inkluż in-numru CAS.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux semplicement ilma.

Annimali tat-test:

— speċi/tipi użati;

— l-istatus mikrobioloġiku ta' l-annimali, meta magħruf;

— in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali (inklużi, meta xieraq, raġornament dwar l-użu ta' maskili minflok femminili);

— is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc.

Kondizzjonijiet tat-test:

— dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi dettalji dwar l-għamla fizika tal-materjal amministrat;

— dettalji dwar l-amminstrazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi l-volumi tad-dożi u l-hin ta' meta tkun ingħata id-doża;

— dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma (inklużi t-tip/sorsi tad-dieta, is-sorsi ta' l-ilma);

— ir-raġjonar għall-għażla tad-doża tal-bidu.

▼B

Riżultati:

- tabulazzjoni tad-dettalji tar-reazzjoni u tal-livell tad-doża għal kull animal (i.e. l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi l-effetti tal-mortalità, in-natura, is-severanza u t-tul ta' l-effetti);
- tabulazzjoni tal-piż tal-gisem u tat-tibdiliet fil-piż tal-gisem;
- il-piżijiet ta' l-annimali individwali fil-jum ma meta jirċievi d-doża, u wara dan matul intervalli ta' darba fil-ġimgha, u il-hin tal-mewt jew ta' meta jkunu maqtula;
- id-data u l-hin tal-mewt jekk qabel il-qtil previst;
- il-korsa tal-hin ta' kif jiskoppjaw is-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kienux reversibbli għal kull animal individwali;
- is-sejbiet tan-nekropsija u s-sejbiet hispatoloġiċi għal kull animal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

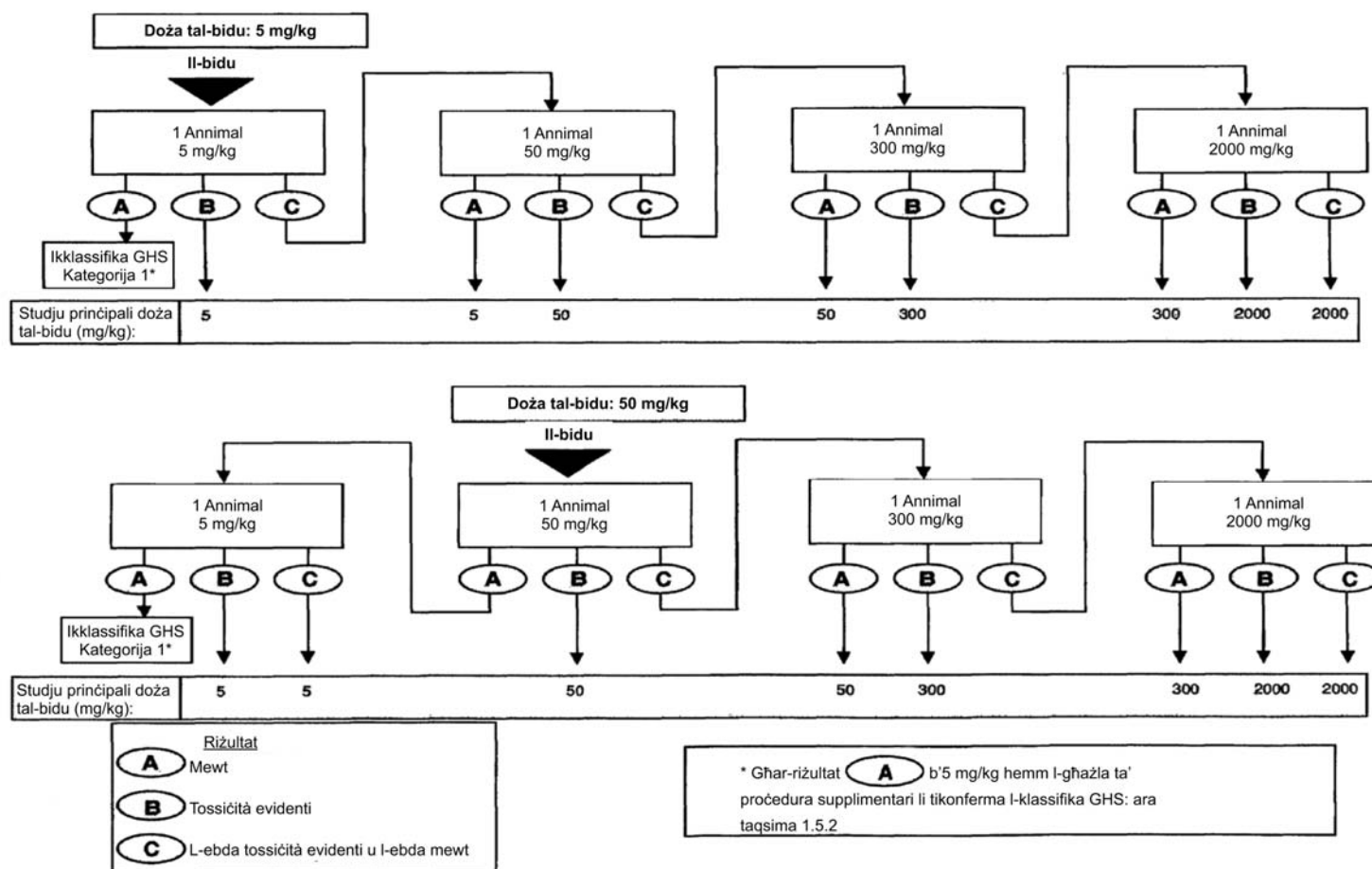
- (1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85-92.
- (2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279-291.
- (3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469-482.
- (4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313-324.
- (5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315-323. *Human Exptl. Toxicol.*
- (6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183-196.
- (7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

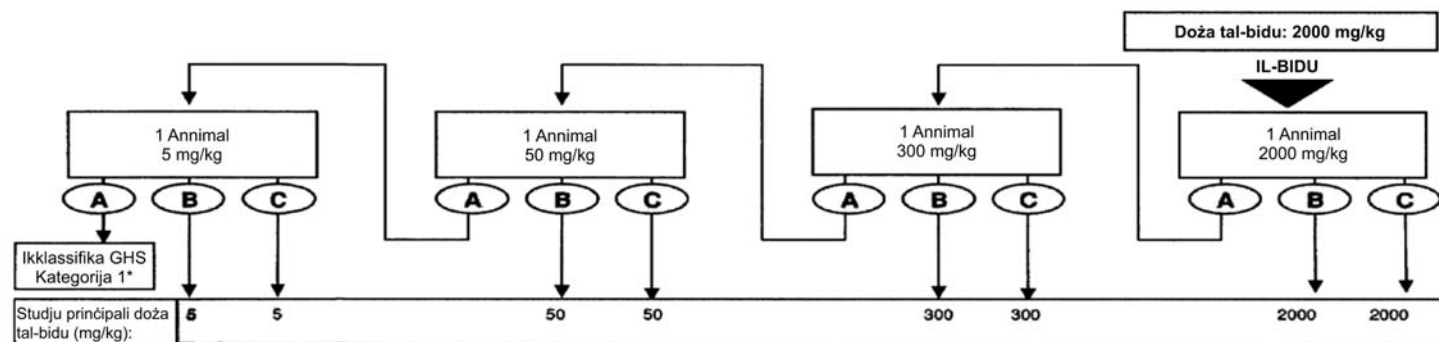
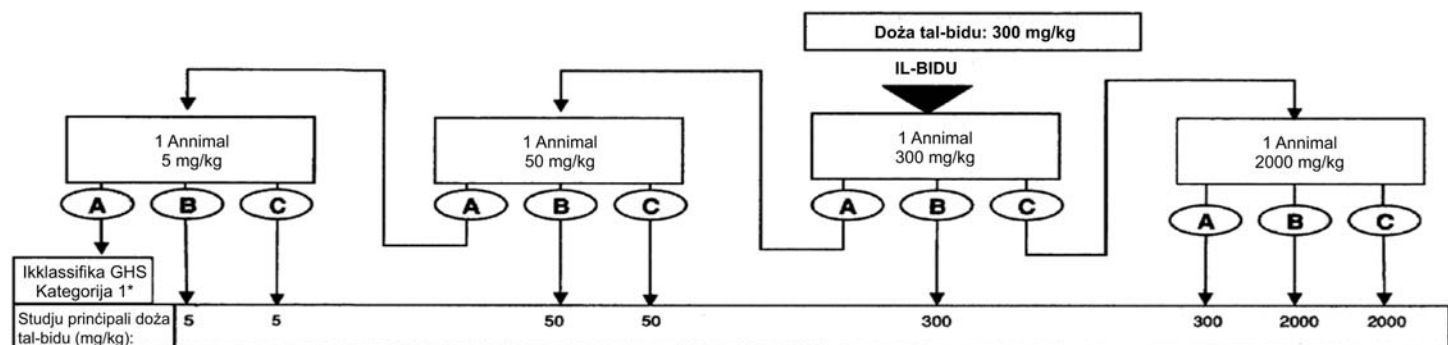
▼B

- (9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 <http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/-displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.htmlh>.
- (10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and- Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231.
- (11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

ANNEX 1

FLOW CHART DWAR L-ISTUDJU TA' OSSERVAZZJONI



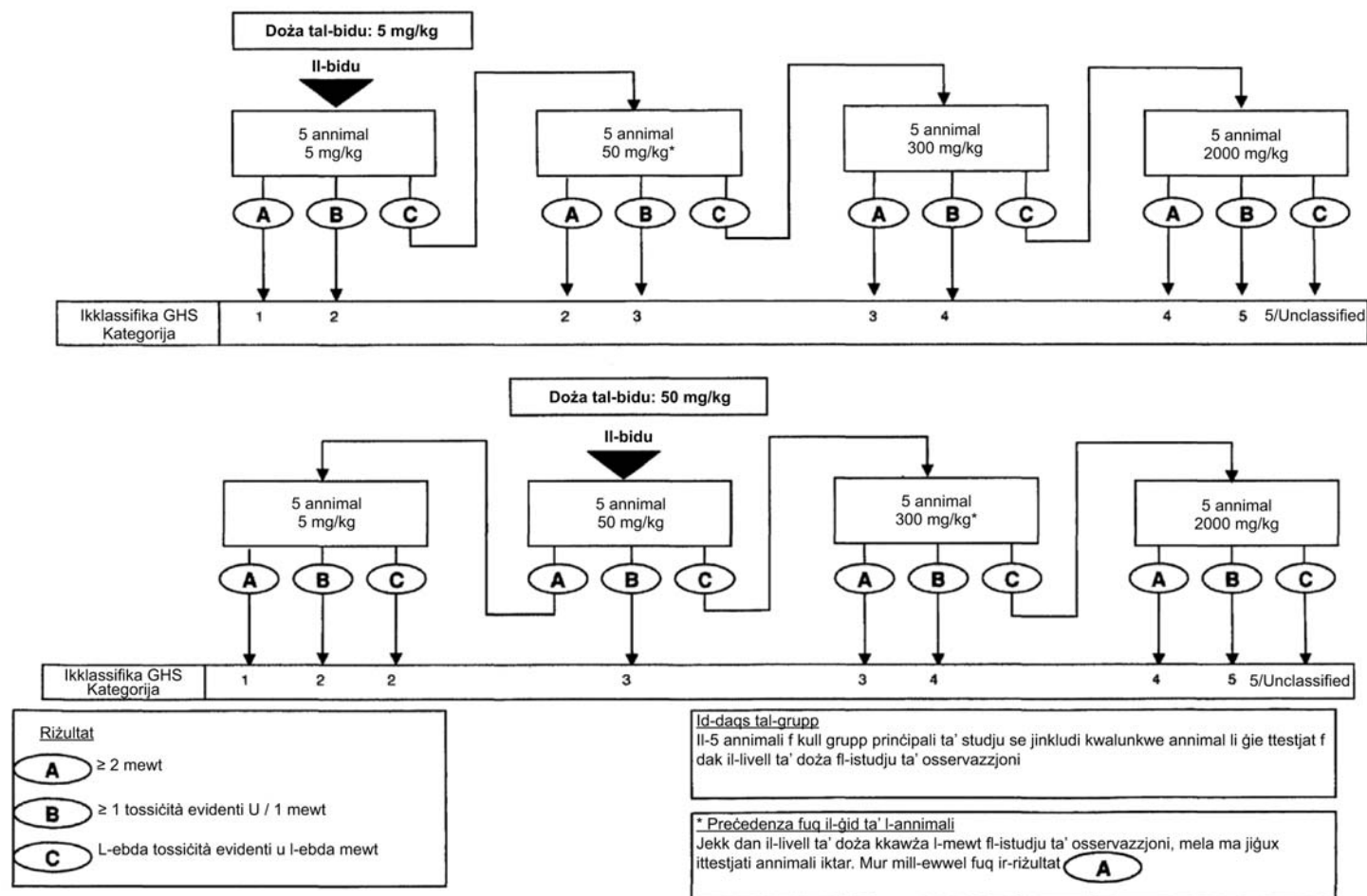


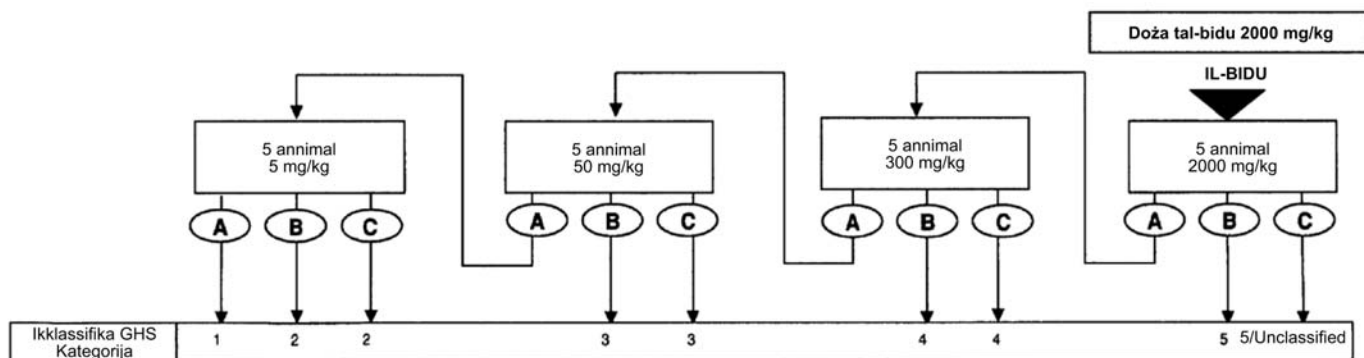
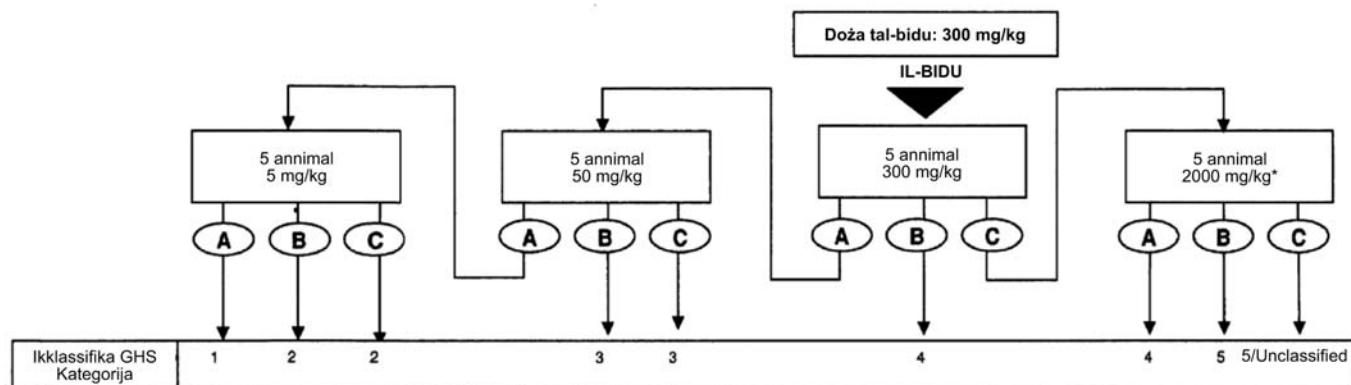
Riżultat	
A	Mewt
B	Tossiċità evidenti
C	L-ebda tossiċità evidenti u l-ebda mewt

* Għar-riżultat **A** b'5 mg/kg hemm l-għażla ta' proċedura supplimentari li tikonferma l-klassifika GHS: ara taqsima 1.5.2

ANNEX 2:

FLOW CHART DWAR L-ISTUDJU EWLIENI





Riżultat

A	≥ 2 mewt
B	≥ 1 tossiċità evidenti / 1 mewt
C	L-ebda tossiċità evidenti u l-ebda mewt

Id-daqs tal-grupp

Il-5 annimali f'kull grupp prinċipali ta' studju se jinkludi kwalunkwe annimal li gie ttestjat f' dak il-livell ta' doża fl-istudju ta' osservazzjoni

* Preċedenza fuq il-ġid ta' l-annimali

Jekk dan il-livell ta' doża kkażza l-mewt fl-istudju ta' osservazzjoni, mela ma jiġux ittestjati annimali iktar. Mur mill-ewwel fuq ir-riżultat **A**.



ANNEX 3

KRITERJI GHALL-KLASSIFIKA TAS-SUSTANZI TAT-TEST B'VALURI MISTENNIJA TA' LD₅₀ LI JEĊĊEDU 2 000 MG/KG MINGHAJR IL-HTIEĠA TA' TESTIJET

Il-kriterji dwar il-periklu tal-Kategorija 5 hija ntiza sabiex tiffaċilita l-identifikazzjoni tas-sustanzi tat-test li huma relattivament f'periklu ta' tossiċità akuta baxxa imma li, skond ċerti ċirkustanzi jistgħu jipprezentaw periklu għall-populazzjonijiet vulnerabbli, dawn is-sustanzi huma antiċipati li jkollhom LD₅₀ orali jew tal-ġilda fil-medda ta' 2 000-5 000 mg/kg jew b'dozi ekwivalenti għal rotot oħra. Is-sustanzi tat-test jistgħu jkunu kklassifikati fil-kategorija tal-periklu definita bi: 2 000 mg/kg <LD₅₀< 5 000 MG/KG (Kategorija 5 fil-GHS) f'dawn il-każi li ġejjin:

- a) jekk ikunu migjuba f'din il-kategorija minn kwalunkwe skemi tat-testijiet ta' l-Anness 2, ibbażati fuq l-inċidenti tal-mortalità;
- b) jekk evidenza affidabbli diġà tkun disponibbli li tindika li l-LD₅₀ tkun fil-medda tal-valuri tal-Kategorija 5 jew li studji oħrajn dwar l-annimali jew ta' l-effetti tossiċi fil-bnedmin umani jindikaw tħassib għas-saħħa umana ta' natura akuta;
- c) permezz ta' estrapolazzjoni, estimi jew kejl tad-dettalji jekk assenjati għal klassi aktar perikoluża milli misthoqq u

— informazzjoni affidabbli kif disponibbli tindika effetti tossiċi sinifikanti fil-bnedmin, jew

— xi mortalità tkun osservata meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4 bir-rotta orali, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma sinjali kliniċi sinifikanti ta' tossiċità, meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4, apparti milli għal dijarrea, piloerezzjoni jew dehra żmattata, jew

— meta ġudizzju minn esperti jikkonferma li l-informazzjoni affidabbli tindika il-potenzjal għal effetti sinifikament akuti minn studji oħrajn fuq l-annimali.

TESTIJET F'DOŽI OGHĠA MINN 2 000 MG/KG

B'mod eċċezzjonali u biss meta ġġustifikat bi htiġiet regolatorji speċifiċi, l-użu ta' doża addizzjonali ffissata fil-livell l-għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkunsidrata. Bir-rikonoxximent tal-htieġa li jkun mħares il-ġid ta' l-annimali, testijiet fi 5 000 mg/kg huma skuragġiti u għandhom biss ikunu kunsidrati meta jkun hemm possibiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu rilevanza diretta għall-harsien tas-saħħa ta' l-annimali jew dik umana (9).

Studju ta' l-osservazzjoni

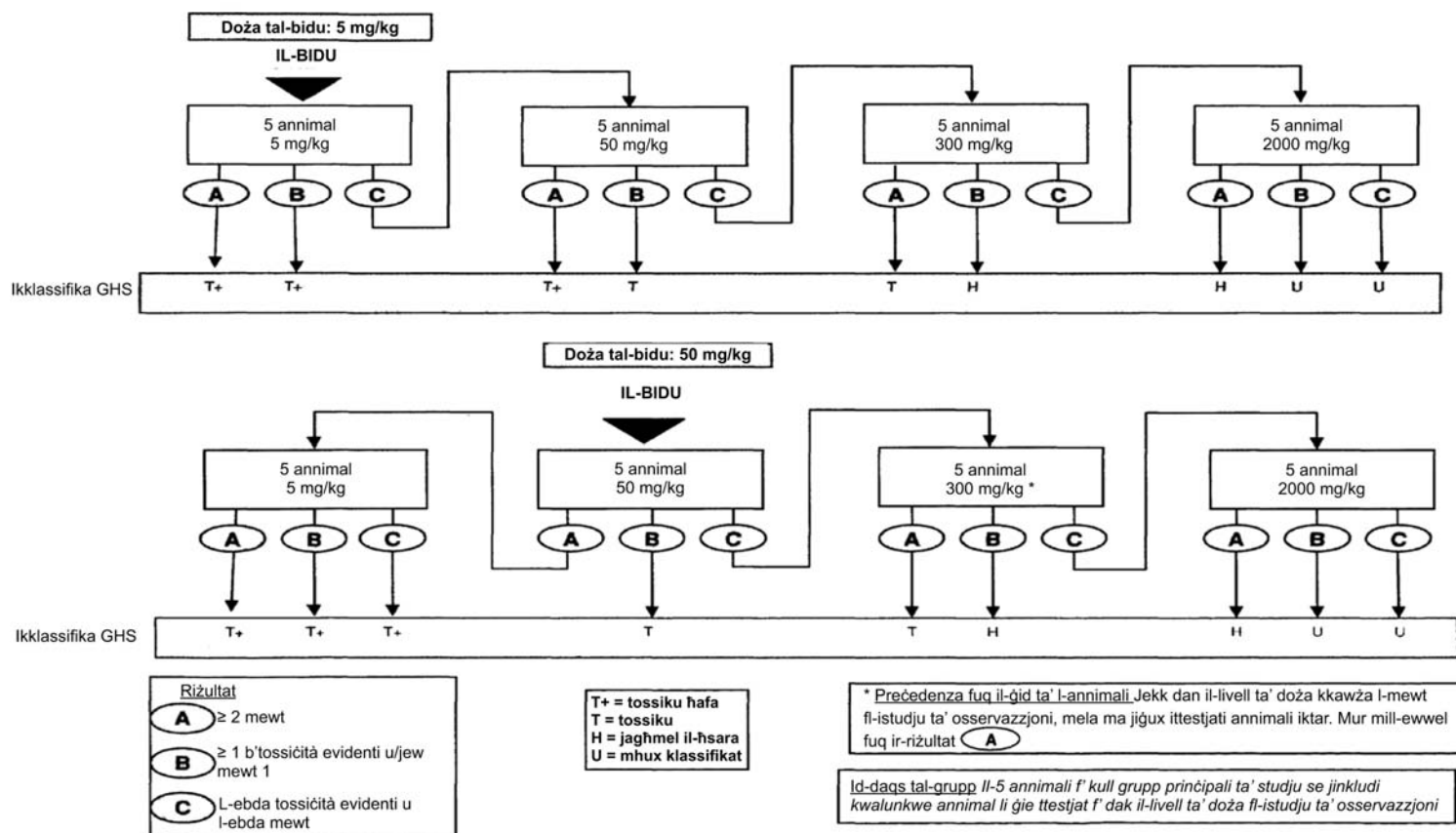
Ir-regoli tad-deċiżjoni li jirregolaw il-proċedura sekwenzjali pprezentata fl-Anness 1 huma estiżi sabiex jinkludu l-livell ta' doża 5 000mg/kg. Għalhekk, meta l-istudju ta' l-osservazzjoni li jibda b'doża ta' 5 000 mg/kg ikun użat, ir-riżultat A (mewt) ikun jehtieġ it-tieni annimal li jkun ittestjat fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat B u C (tossiċità evidenti jew l-ebda tossiċità) ikunu jippermettu l-għażla ta' 5 000 mg/kg bħala d-doża tal-bidu fl-istudju ewlieni. Bl-istess mod, jekk id-doża tal-bidu apparti milli ta' 5 000 mg/kg tkun użata, allura t-test għandu jippreċedi għal 5 000 mg/kg fil-każ tar-riżultati B jew C fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat A sussegwenti ta' 5 000 mg/kg ikun jimponi studju ewlieni li jibda b'doża ta' 2 000 mg/kg u r-riżultati B u C ikunu jimponu studju ewlieni li jibda b'doża ta' 5 000 mg/kg.

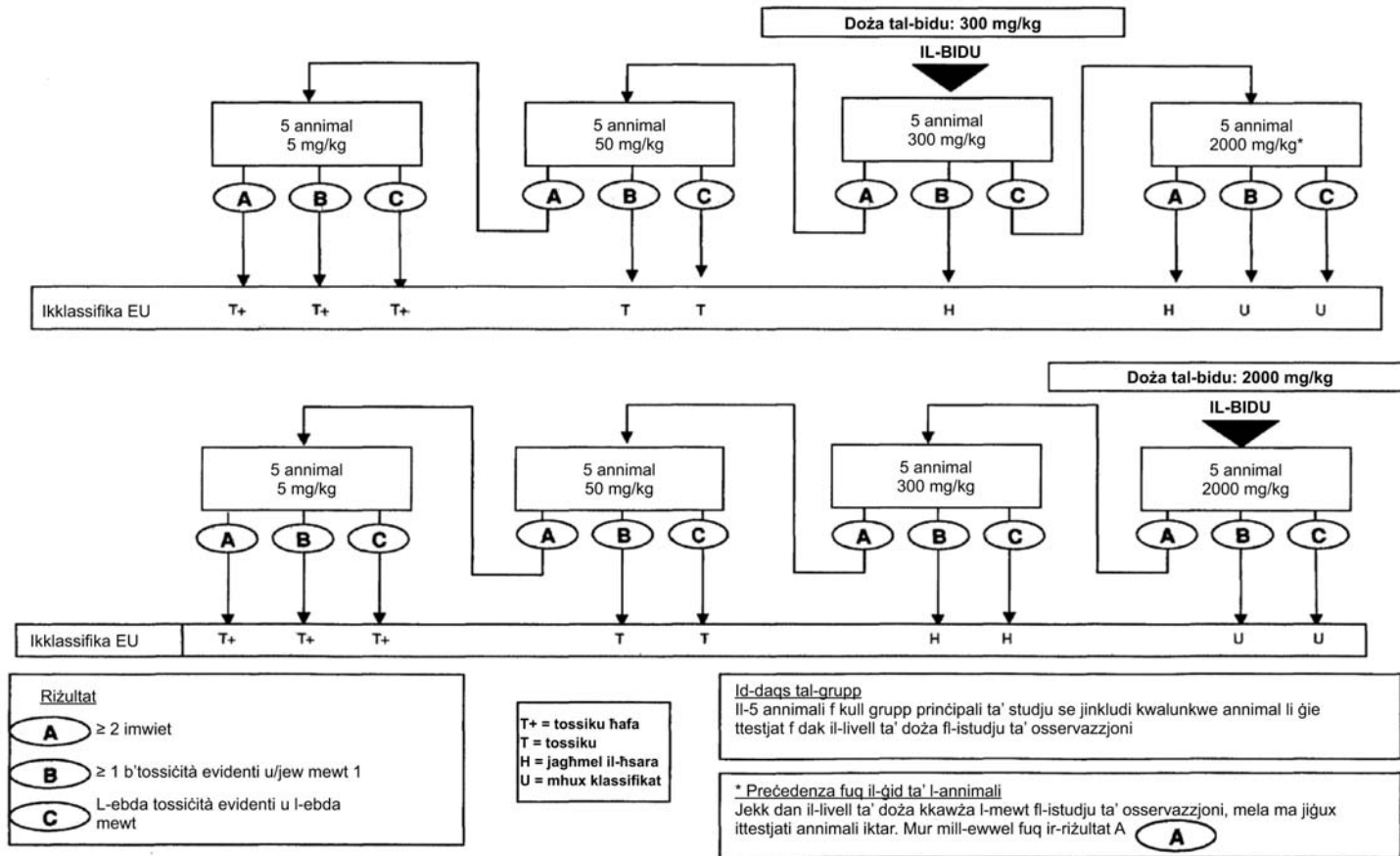
▼B**Studju Ewlieni**

Ir-regoli tad-deċiżjoni li jirregolaw il-proċedura sekwenzjali ppreżentata fl-Anness 2 huma estiżi sabiex jinkludu l-livell ta' doża 5 000 mg/kg. Għalhekk, meta d-doża ta' l-istudju ewlieni li tibda bi 5 000 mg/kg tkun użata, ir-riżultat A (≥ 2 imwiet) ikun jehtieġ it-testijiet tat-tieni grupp fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat B (tossicità evidenti u/jew $\leq$ mewt 1) jew C (l-ebda tossicità) ikun jirriżulta filli s-sustanza ma tkunx ikklassifikata skond il-GHS. L-istess, jekk id-doża tal-bidu appartni milli ta' 5 000 mg/kg tkun użata, allura t-test ikun jiproċedi lejn il-5 000 mg/kg fil-każ tar-riżultat C fi 2 000 mg/kg; ir-riżultat A sussegwenti ta' 5 000 mg/kg ikun jirriżulta filli s-sustanza tkun assenjata għal GHS Kategorija 5 u r-riżultati B jew C ikunu jwasslu li s-sustanza ma tkunx ikklassifikata.

METODU TAT-TEST B.1.

bis Gwida dwar il-klassifika skond l-iskema UE li tkopri l-perjodu tranzitorju sat-tmiem shih ta' l-implimentazzjoni kollha tas-Sistema Armonizzata tal-Klassifika Globali (GHS) (mehud mir-referenza (8))







B.1 TRIS. TOSSICITÀ ORALI AKUTA – METODU TAL-KLASSIFIKA TOSSIKA AKUTA

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għal OECD TG 423 (2001)

1.1. INTRODUZZJONI

Il-metodu tal-klassi tat-tossicità akuta (1) kif stabbilit f'dan it-test huwa l-proċedura sussegwenti ma l-użu ta' 3 annimali ta' sess wiehied għal kull pass. Jiddependi mill-mortalità u/jew l-istat ta' modibondi li jkunu fih l-annimali, bħala medja 2-3 passi jkunu meħtieġa sabiex jippermetti li jsir gudiżju dwar it-tossicità akuta tas-sustanza tat-test. Din il-proċedura hija riproducibbli, tuża f'it annimali u hija kapaċi li tiggrada sustanzi b'manjera simili għall-metodi l-oħrajn tat-testijiet dwar it-tossicità akuta. Il-metodu tal-klassi tat-tossicità akuta huwa bbażat fuq evalwazzjonijiet biometriċi (2) (3) (4) (5) b'dozi fissi, separati b'mod adegwat sabiex jippermettu li sustanza tkun iggradata għall-iskopijiet tal-klassifika u ta' l-assessjar tal-periklu. Il-metodu kif adottat fil-1996 kien ġie validat b'mod estensiv *in vivo* bi tqabbil mad-dettalji JD₅₀ akkwistati mil-letteratura, kemm nazzjonali (6) u dik internazzjonali (7).

Gwida dwar l-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq għal skop partikolari tista' tinstab fid-Dokument ta' Gwida dwat it-Testijiet tat-Tossicità Orali Akuta (8). Dan id-Dokument ta' Gwida fih ukoll informazzjoni addizzjonali dwar it-twettieq u l-interpretazzjoni tal-metodu tat-test B. 1 tris.

Is-sustanzi tat-test, fid-dozi li huma magħrufa li jikkagunaw uġiegh qawwi u tbatija minhabba l-azzjonijiet korrossivi jew severament irritanti, ma jistgħux ikunu amministrati. Annimali fl-għafja tal-mewt, jew annimali avvjamment bl-uġiegh jew li juru sinjali ta' tbaġhtija qawwija għandhom ikun u maqtula b'mod umanitarju, u huma meqjusa fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test bl-istess mod bħal dawk l-annimali li jmutu matul it-test. Il-kriterja sabiex tittiehed id-deċiżjoni li jkunu maqtula l-annimali fl-għafja tal-mewt jew dawk li jkunu jbaġhtu hafna, u l-gwida dwar ir-rikonossiment ta' mewt mistennija jew prevista, huma s-suġġett ta' Dokument ta' Gwida separat (9).

Dan il-metodu jutilizza dozi definiti bil-quddiem u r-riżultati jippermettu li sustanza tkun gradata u klassifikata skond is-Sistema Globali Armonizzata għall-klassifika ta' kimiċi li jikkagunaw tossicità akuta (10).

Bħala prinċipju, il-metodu mhux intiz li jippermetti l-kalkolu ta' LD₅₀ preċiż, imma fil-fatt jippermetti għad-determinazzjoni ta' medded ta' esposizzjoni definita meta l-letalità tkun mistennija minhabba li l-mewt ta' proporzjoni ta' l-annimali tkun xorta wahda l-għan finali ewlieni ta' dan it-test. Il-metodu jippermetti għad-determinazzjoni tal-valur LD₅₀ biss meta mill-anqas żewġ dozi jirriżultaw f'mortalità għola minn 0 % u anqas minn 100 %. L-użu ta' għażla ta' dozi definiti bil-quddiem, independentement mis-sustanza tat-test, bil-klassifika esplicitament marbuta man-numri ta' l-annimali osservati f'diversi sitwazzjonijiet ittejjeb l-opportunità għar-rapurtagg ta' bejn laboratorju u laboratorju, b'konsistenza u repatabilità.

▼B

Il-laboratorju tat-test għandu jikkonsidra l-informazzjoni disponibbli kollha dwar is-sustanza tat-test qabel ma jwettagħ l-istudju. Tali informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza, il-propjetajiet fizikokimiċi tagħha; ir-riżultat ta' xi testijiet oħrajn *In vivo* jew *in vitro* dwar is-sustanza; id-dettalji tossikoloġiċi dwar is-sustanzi strutturament relatati; u l-użu antiċipat tas-sustanza. Din l-informazzjoni hija meħtieġa sabiex tissodisfa lil dawk kollha ikkonċernati li t-test huwa relevanti għall-protezzjoni tas-saħħa umana u li jkun ta' għajjnuna fl-għażla tad-doża tal-bidu l-aktar xierqa.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossiċità akuta orali: Tirreferi għal dawk l-effetti ħżiena li jsejnhu wara l-amministrazzjoni orali ta' doża singola ta' sustanza jew ta' dozi multipli mogħtija matul 24 siegħa.

Mewt imdewma: Tfisser li annimal ma jmutx u ma jkunx jidher f'għafja tal-mewt fi żmien 48 siegħa imma li jmut aktar tard matul il-perjodu ta' l-osservazzjoni ta' 14-il jum.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test kif somministrata. Id-doża hija espressa bħala piż tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-piż ta' l-annimal ittestjat (eż. mg/kg).

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. Is-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata għal Sustanzi u Tahlitiet Kimiċi. Attività kongunta tal-OECD (is-saħħa umana u l-ambjent), Il-Kumitat ta' Esperti tal-NU dwar it-Trasport ta' Ogġetti Perikolużi (il-propjetajiet fiżiċi/kimiċi) u l-ILO (kommunikazzjoni perikoluża) u l-kordinazzjoni mill-Programm Interorganizzazzjonali għal Amministrazzjoni Soda tal-Kimika (IOMC).

Imwiet imminenti: Meta l-istat fl-għafja tal-mewt jew il-mewt ikunu mistennija qabel il-hin ippjanat segwenti ta' l-osservazzjoni. Sinjali indikattivi għal dan l-istat f'annimali gerriema jistgħu jinkludu konvulżjonijiet, posizzjoni ta' serħan fuq il-ġemb, mitluqa fuq darhom, u tregħid (Ara d-Dokument ta' Gwida ta' l-Għan Finali b'mod Umanitarju (9) għal aktar dettalji).

LD₅₀ (doża orali medja ta' l-mwiet): Hija doża akkwistata b'mod statistiku ta' sustanza li tista' tkun mistennija li tikkaguna l-mewt fi 50 fil-mija ta' l-annimali meta amministrata bir-rotta orali. Il-valur LD₅₀ huwa espress f'termini ta' piż tas-sustanza tat-test għal kull unità piż ta' l-annimal tat-test (mg/kg).

Doża b'limitu: Tirreferi għad-doża fil-limitu l-aktar għoli tat-testijiet (2 000 jew 5 000 mg/kg).

Stat moribund (fl-għafja tal-mewt): Huwa l-istat li jwassal għall-mewt jew ta' nuqqas ta' kapaċità għal hajja, anki jekk ittrattat (ara d-Dokument ta' Gwida dwar it-Tmiem Finali b'mod Umanitarju (9) dwar aktar dettalji).

Mewt mistennija: Il-preżenza ta' sinjali kliniċi indikattivi tal-mewt fi żmien mistenni jew inkella fil-gejjieni imma qabel it-tmiem ippjanat ta' l-esperiment, per eżempju: l-inabbiltà li jersaq lejn l-ilma u lejn l-ikel. (Ara d-Dokument ta' Gwida tat-Tmiem Umanitarju (9) dwar aktar dettalji).

▼B**1.3. IL-PRINCIPJU TAT-TEST**

Huwa l-principju tat-test li, ibbażat fuq il-proċedura ta' pass b'pass, bl-użu ta' numru minimu ta' annimali kull pass, informazzjoni suffiċjenti tkun akkwista dwar it-tossiċità akuta tas-sustanza tat-test sabiex tiffaċilita l-klassifika tagħha. Is-sustanza hija ammenis-trata b'mod orali fuq grupp ta' annimali sperimentali b'wahda mid-dożi definiti. Is-sustanza hija ittestjata bl-użu tal-proċedura tal-pass b'pass, kull pass jutilizza tlett annimali ta' sess wiehed (normalment nisa). In-nuqqas jew il-preżenza ta' mortalità relatata mal-kompost ta' l-anniamli bid-doża. Ta' l-ewwel pass tkun tiddetermina l-pass segwenti, i.e.:

— l-ebda aktar testijiet ma jkunu meħtieġa,

— id-doża fuq tlett annimali, bl-istess doża,

— id-doża fuq tlett annimali addizzjonali fil-livell aktar għoli segwenti jew fil-livell aktar baxx preċedenti.

Id-dettalji tal-proċedura tat-test huma deskritti fl-Anness I. Il-metodu ikun jiffaċilita ġudizju fir-rigward tal-klassifika ta' sustanza tat-test lejn wahda mis-serje tal-klassijiet ta' tossiċità definiti bil-valuri fissi LD-50 bħala waqfien.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.4.1. L-ghażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

L-ispeċi preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċi oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Normalment ikunu użata il-femminili (9). Dan huwa minhabba li listharriġ letterarju tat-testijiet konvenzjonali LD-50 juru li normalment ikun hemm f'it differenza fis-sensittività bejn is-sessi, imma li f'dawk il-każi meta d-differenzi jkunu osservati, in-nisa ikunu ġeneralment kemm xejn aktar sensittivi (11). B'dana kollu, jekk tagħrif dwar il-propjetajiet tossikoloġiċi jew tossikinetiċi ta' kimiċi strutturament relatati jindika li l-irġiel aktarx li jkunu aktar sensittivi, allura dak is-sess għandu jkun użat. Meta t-test ikun imwettaq fuq maskili, ġustifikazzjoni adegwata għandha tkun ipprovduta.

Annimali zghazagh adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Kull animal, fil-bidu ta' meta jkun sejjer jingħata doża, għandu jkun f'età ta' bejn 8 u 12 il-ġimgha u l-piż tiegħu għandu jkun fil-medda ta' $\pm 20\%$ tal-piż medju ta' dawk l-annimali li preċedement ikun u ntuzaw għad-dożi.

1.4.2. Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-għalf

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali sperimentali għandha tkun $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30% u preferibbilment ma teċċedix 70% apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-għand għandu jkun ta' $50\text{--}60\%$. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-annimali jistgħu ikunu miġbura flimkien bħala grupp skond id-doża, imma n-numru ta' l-annimali f'kull gaġġa m'għandux ifixxkel l-osservazzjonijiet ċari ta' kull animal.

▼B**1.4.3. Preparazzjoni ta' l-annimali**

L-annimali għandhom ikunu magħżula kif jinzerta, immarkati sabiex jippermettu identifikazzjoni individwali, u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mil anqas 5 tijiem qabel il-bidu tad-dożi sabiex jippermettu li jkunu akklamattizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

1.4.4. Preparazzjoni tad-dożi

Generalment, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu amministrati f'volum kostanti matul medda ta' dożi tat-testijiet bil-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni fil-preparazzjoni tad-dożi. Meta, b'dana kollu, likwidu jew tahlita ikunu l-prodott finali, l-użu ta' sustanza tat-test mingħajr trattib, i.e. konċentrazzjoni kostanti, tista' tkun aktar rilevanti għall-istudju sussegwenti tar-riskju ta' dik is-sustanza, u hija htieġa għal uħud mill-awtoritajiet regolatorji. Fi kwalunkwe każ, il-volum massimu tad-doża għall-amministrazzjoni m'għandux ikunu misbuq. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wiehed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Fl-annimali gerriema, il-volum m'għandux normalment jeċċedi 1ml/100g tal-piż tal-ġisem: b'dana kollu fil-każ ta' tahlitiet akweji, 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jkun ikkonsidrat. Fir-rigward tal-formulazzjoni tal-preparazzjoni tad-doża, l-użu ta' tahlita/sospensjoni/emulsifikazzjoni akweja hija rakkommandata kull meta possibbli, segwita f'ordni ta' preferenza bit-tahlita/sospensjoni/emulsifikazzjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħ-ir-rum) u mbagħad il-possibbiltà ta' likwidi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il-karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. Id-dożi għandhom ikunu ppreparati ftit qabel l-amministrazzjoni, sakemm l-istabbiltà tal-preparazzjoni matul il-perjodu ta' l-użu tkun magħrufa u turi li tkun aċċettabbli.

1.5. PROCEDURA**1.5.1. Amministrazzjoni tad-dożi**

Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doża wahda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi intubazzjoni canula xierqa. F'ċirkostanzi mhux tas-soltu li fihom doża wahda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix 1-24 siegħa.

L-annimali għandhom ikunu msajma qabel ma jingħataw id-doża (eż. għall-firien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul il-lejl sal-hin ta' l-esperiment; fil-każ ta' ġurdien, l-ikel imma mhux ilma għandu jkun imċaħħad għal ma tul 3-4 siegħat). Wara l-perjodu tas-sawma, l-annimali għandhom ikunu miżuna u s-sustanza tat-test tkun somministrata. Wara li s-sustanza tat-test tkun somministrata, l-ikel jista' jkun imċaħħad għal 3-4 siegħat ohra fil-każ tal-firien jew 1-2 siegħat fil-każ tal-ġurdien. Meta d-doża tkun somministrata fi frazzjonijiet matul perjodu ta' żmien, jista' jkun meħtieġ li l-annimali jkunu ipprovduti b'ikel u ilma, jiddependi mit-tul tal-perjodu.

1.5.2. Numru ta' l-annimali u l-livelli tad-dożi

Tlett annimali huma użati għal kull pass. Il-livell tad-doża li għandu jkun użat bħala d-doża tal-bidu jkun magħżul minn wiehed minn erba' livelli fissi, 5, 50, 300 u 2 000 mg/kg piż tal-ġisem. Il-livell tad-doża tal-bidu għandu jkun dak li jkun l-aktar probabbli li jipproduci mortalità f'uħud mill-annimali li jkunu reċewew id-doża. Il-karti tan-nixxija ta' l-Anness 1 jiddeskrivu l-proċedura li għandha tkun segwita għal kull wahda mid-dożi tal-bidu. B'zieda, l-Anness 4 jagħti gwida dwar il-klassifika fis-sistema UE sakemm GHS ġdida tkun implementata.

▼B

Meta l-informazzjoni disponibbli tissuggerixxi li l-lortalità pjuttost li ma ssehhx fl-ghola livell tal-bidu (2 000 mg/kg piż tal-gisem), allura test tal-limitu għandu jkun imwettaq. Meta ma jkunx hemm informazzjoni dwar xi sustanza li għandha tkun ittestjata, għal raġunijiet tal-ġid ta' l-annimali, huwa rakkommandabbli li jsir użu minn doża tal-bidu ta' 300 mg/kg piż tal-gisem.

L-intervall tal-hin bejn id-dożi f'kull wiehed mill-livelli huwa determinat bl-iskoppjar, it-tul, u s-severità, tas-sinjali tossiċi. It-trattament ta' l-annimali fid-doża segwenti għandu jkun imdewwem sakemm wiehed ikun żgur bis-sopravivenza ta' l-annimali li jkunu irečevew id-doża prečedentament.

B'mod eččezzjonali, u biss meta iġġustifikat bi htigiet regolatorji spečifiči, l-użu ta' doża addizzjonali iffissata fil-livell għoli ta' 5 000 mg/kg tista' tkun ikkonsiderata (ara l-Anness 2). Għal raġunijiet li jikkoncernaw il-ġid ta' l-annimali, it-testijiet ta' l-annimali skond GHS, il-Kategorija 5, il-meded (2 000-5 000 mg/kg huma ferm skorraġiti u għandhom biss ikunu ikkonsiderati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn tali test ikollu rilevanza diretta għall-rotezzjoni umana jew tas-saħħa ta' l-annimali jew dik ambjentali.

1.5.3. **Test tal-limitu**

It-test tal-limitu huwa primarjament użat f'sitwazzjonijiet meta dak li jwettaq l-esperiment ikollu informazzjoni li tindika li l-materjal tat-test ma jkunx tossiku, i.e. li jkollu tossiċità biss aktar mil-limitu regolatorju tad-dożi. L-informazzjoni dwar it-tossiċità tal-materjal tat-test tista' tkun akkwistat mit-tagħrif dwar komposti simili li kienu ġew ittestjati jew minn tahlitiet jew prodotti simili li kienu ġew ittestjati, billi tkun meqjusa l-identità u l-persentaġġ tal-komponenti magħrufa li huma ta' sinifikanza tossikoloġika. F'dawk is-sitwazzjonijiet meta jkun f'it jew l-ebda informazzjoni dwar. It-tossiċità tagħha, jew li fiha l-materjal tat-test ikun mistenni li jirriżulta tossiku, it-test ewlieni għandu jkun imwettaq.

Test tal-limitu f'doża waħda fil-livell ta' 2 000 mg/kg piż tal-gisem jista' jitwettaq fuq sitt annimali (tlett annimali kull pass). B'mod eččezzjonali, test tal-limitu b'doża waħda fil-livell ta' 5 000 mg/kg jista' jkun imwettaq fuq tlett annimali (ara l-Anness 2). Jekk il-mortalità tat-test relatata mas-sustanza tirriżulta, aktar testijiet fil-livell prečedenti aktar baxx jista' jkun hemm il-htieġa li jitwettqu.

1.6. **OSSERVAZZJONIJIET**

L-annimali osservati individwalment wara l-ewwel doża mill-anqas darba matul l-ewwel 30 minuta, perjodikament matul l-ewwel 24 siegħa, b'attenzjoni spečjali mogħtija matul l-ewwel 4 siegħat, u ta' kull minn hemm il-quddiem, għal total ta' 14-il jum, apparti minn meta jkun meħtieġ li dawn jitnehhew mill-istudju u li jkunu maqtula b'mod umanesk għal raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali jew inkella li jinsabu mejta. B'dana kollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandhux ikun iffissat b'mod rigoruż. Għandu jkun determinat bir-reazzjoni tossika, il-hilata' l-iskoppjar u t-tul tal-perjodu ta' l-irkupru, u jista' b'hekk ikun estiż meta ikkonsiderat bħala meħtieġ. Il-hinijiet li fihom is-sinjali tat-tassiċità jkunu apparaenti jew li jisparixxu huma. Importanti, spečjalment meta jkun hemm tendenza li s-sinjali tossiċi jkunu mdewma (12). L-osservazzjonijiet kollha huma sistematista'ment irreġistrati, b'dettalji individwali jkunu jinżammu għal kull annimal.

▼B

Osservazzjonijiet addizzjonali jkunu meħtieġa jekk l-annimali jkomplu juru sinjali ta' tossiċità. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu xi tibdil fil-gilda u s-suf, l-ghajnejn, fil-membrani mukaneji, u wkoll fis-sistemi respiratorji, ċirkulatorji, awtonomiċi u tan-nervituri ċentrali, u l-attività somatomuturali u t-tip ta' l-imġieba. Attenzjoni għandha tkun diretta għall-osservazzjonijiet ta' roda, konvulzjonijiet, rieg, diarreja, letargija, irqad u koma. Il-prinċipji u l-kriterja kif aggruppati fid-Dokument ta' Gwida dwar il-Miri Umanitarji għandhom ikunu ikkonsidrati (9). L-annimali misjuba f'kundizzjoni moribonda u l-annimali li juru sinjali ta' uġieħ qawwi jew li jgħaddu minn sinjali ta' tbgħatija, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju. Meta l-annimali jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji jew jekk jinstabu mejta, il-hin tal-mewt għandu jkun registrat bi preċiżjoni kemm jista' jkun possibbli.

1.6.1. **Piż tal-gisem**

Il-piżijiet ta' l-annimali individwali għandhom ikunu determinati kemxejn qabel ma s-sustanza tat-test tkun somministrata u mill-anqas darba fil-gimgha wara dan. Tibdiliet fil-piż għandhom ikunu ikkalkolati u rreġistrati. Fit-tmiem tat-test, l-annimali li jibqgħu hajjin għandhom ikunu miżuna w imbagħas maqtula b'mod umanitarju.

1.6.2. **Patoloġija**

L-annimali kolha tat-test (inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jkunu mnehhija mill-istudju minhabba raġunijiet tal-benesseri ta' l-annimali għandhom ikunu suġġetti għal nekropsija ġenerali. It-tibdiliet patoloġiċi ġenerali għandhom ikunu irreġistrati għal kull annimal. Eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi li juri evidenza patoloġika ġenerali fl-annimali li jibqgħu hajjin għa 24 siegħa jew aktar wara li jkunu rċevew id-doża inizjali għandha wkoll tkun ikkunsidrata minhabba li din tista' tforni informazzjoni utili.

2. **DATA**

Data ta' l-annimal individwali għandha tkun ipprovduta. B'zieda ma dan, id-dettalji kollha għandhom ikunu miġbura f'sommarju, li juru għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali użati, in-numru ta' l-annimali ji jkollhom sinjali ta' tossiċità, in-numru ta' l-annimali li jinstabu mejta matul it-test jew li jkunu maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-hin tal-mewt ta' l-annimali individwali, deskrizzjoni u l-korsa tal-hin ta' l-effetti tossiċi, u r-riversabbiltà ta' dawn, u s-sejbiet tan-nekropsija.

3. **RAPPORTAĠĠ**3.1. **Rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skond kif xieraq:

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fiżika, il-purità, u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi (inkluża l-izomerizzazzjoni);

— dettalji ta' l-identifikazzjoni, inkluż in-numru CAS.

Mezz (jekk applikabbli):

— ġustifikazzjoni dwar l-ghazla tal-mezz, jekk mhux semplicement ilma.

Annimali tat-test:

— speci/tipi użati;

▼B

- l-istatus mikrobiologiku ta' l-annimali, meta magħruf;
- in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali (inklużi, meta xieraq, raġornament dwar l-użu ta' maskili minflok femminili);
- is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc.

Kondizzjonijiet tat-test:

- dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi dettalji dwar l-ghamla fiżika tal-materjal amministrat;
- dettalji dwar l-amminstrazzjoni tas-sustanza tat-test, inklużi l-volumi tad-dożi u l-hin ta' meta tkun ingħata d-doża;
- dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma (inklużi t-tip/sorsi tad-dieta, is-sorsi ta' l-ilma);
- ir-raġjonar għall-ghażla tad-doża tal-bidu.

Riżultati:

- tabulazzjoni tad-dettalji tar-reazzjoni u tal-livell tad-doża għal kull animal (i.e. l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi l-effetti tal-mortalità, in-natura, is-severanza u t-tul ta' l-effetti);
- tabulazzjoni tal-piż tal-ġisem u tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem;
- il-piżijiet ta' l-annimali individwali fil-jum ma meta jirċievi d-doża, u wara dan matul intervalli ta' darba fil-ġimgħa, u l-hin tal-mewt jew ta' meta jkunu maqtula;
- id-data u l-hin tal-mewt jekk qabel il-qtil previst;
- il-korsa tal-hin ta' kif jiskoppjaw is-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kienux reversibbli għal kull animal individwali;
- is-sejbiet tan-nekropsija u s-sejbiet hispatologiċi għal kull animal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

Konkluzjonijiet.

4.

REFERENZI

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. ALTEX 16, 129-134.
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 (<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>).
- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I, Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

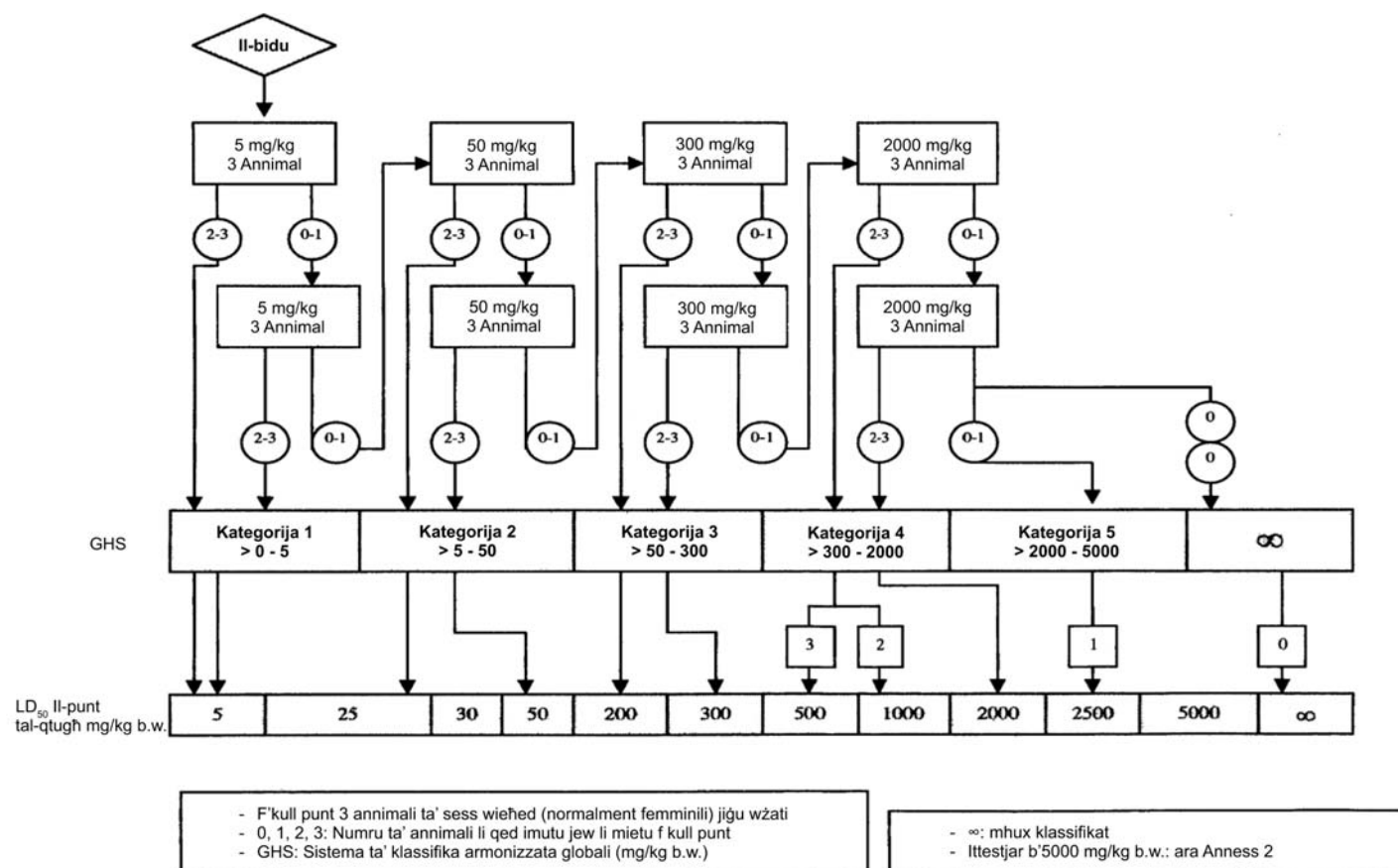
*ANNESS I***PROĊEDURA LI GHANDHA TKUN SEGWITA GHAL KULL WAHDA
MID-DOĠI TAL-BIDU***RIMARKI ĠENERALI*

Għal kull doża tal-bidu, l-iskemi rispettivi tat-testijiet, kif inkluzi f'dan l-Anness, jelenkaw il-proċedura li għandha tkun segwita.

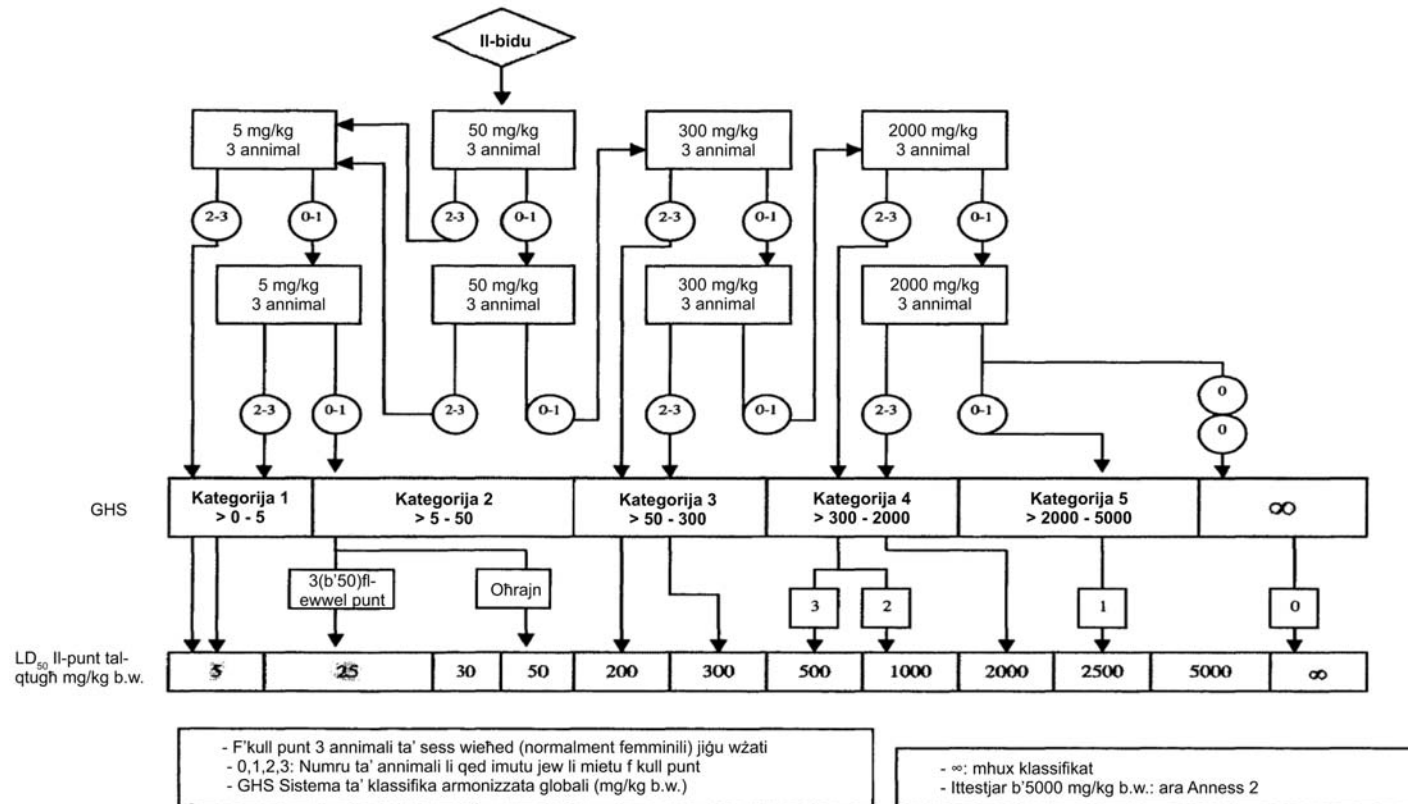
- Anness 1 a: Id-doża tal-bidu hija: 5 mg/kg piż tal-ġisem
- Anness 1 b: Id-doża tal-bidu hija: 50 mg/kg piż tal-ġisem
- Anness 1 c: Id-doża tal-bidu hija: 300 mg/kg piż tal-ġisem
- Anness 1 d: Id-doża tal-bidu hija: 2 000 mg/kg piż tal-ġisem

Jiddependi min-numru ta' annimali maqtula b'mod umanitarju jew ta' l-annimali mejta, il-proċedura tat-test għandha ssegwi il-vleġġ indikati.

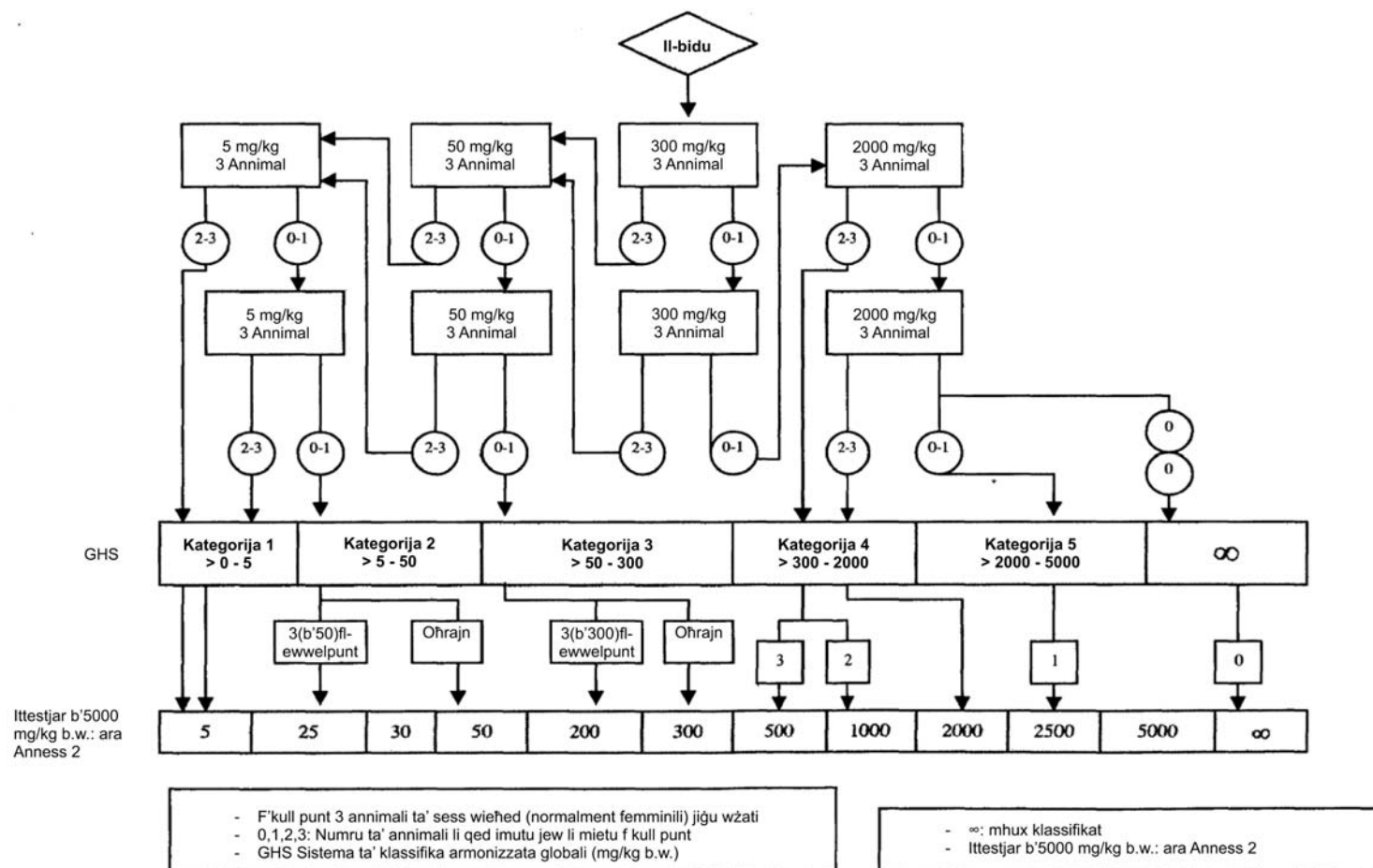
PROCEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 5 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



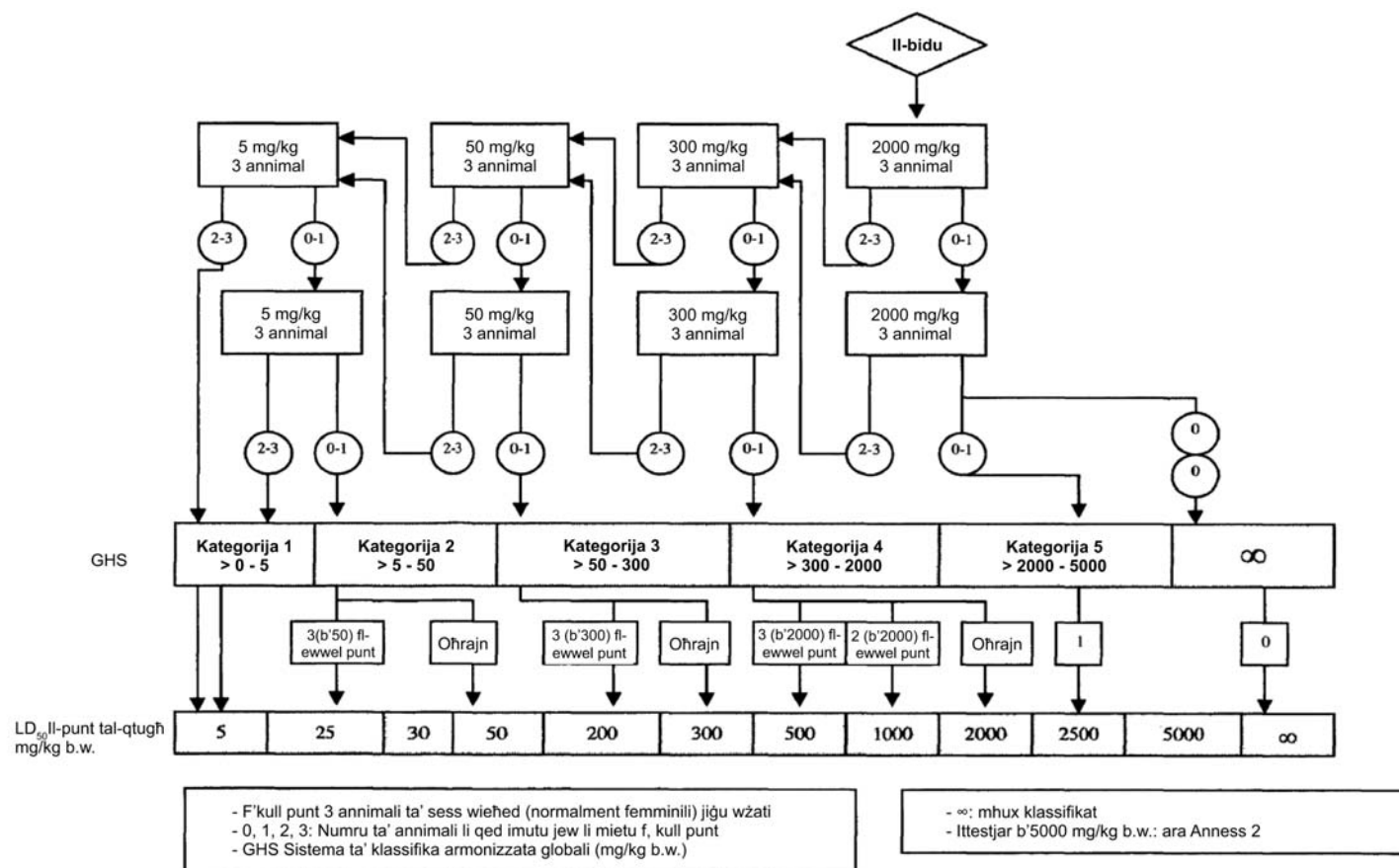
PROCEDURA TAT-TEST B'DOĠA TAL-BIDU TA' 50 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



PROCEDURA TAT-TEST B'DOŻA TAL-BIDU TA' 300 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM



PROĊEDURA TAT-TEST B'DOĠA TAL-BIDU TA' 2 000 MG/KG PIŻ TAL-ĠISEM





ANNEX 2

**KRITERJA GHALL-KLASSIFIKA TAS-SUSTANZI TAT-TEST
B'VALURI MISTENNIJA TA' LD₅₀ LI JEĊĊEDU 2 000 MG/KG
MINGHAJR IL-HTIEĠA TA'TESTIJET**

Il-kriterji dwar il-periklu tal-Kategorija 5 hija ntiza sabiex tiffaċilita l-identifikazzjoni tas-sustanzi tat-test li huma relattivament f'periklu ta' tossiċità akuta baxxa imma li, skond ċerti ċirkostanzi jistgħu jipprezentaw periklu għall-populazzjonijiet vulnerabbli. Dawn is-sustanzi huma antiċipati li jkollhom LD₅₀ orali jew tal-ġilda fil-medda ta' 2 000 - 5 000 mg/kg jew b'dozi ekwivalenti għal rotot oħrajn. Is-sustanzi tat-test jistgħu ikunu klassifikati fil-kategorija tal-periklu definita bi: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (Kategorija 5 fil-GHS) f'dawn il-kazi li ġejjin:

- a) jekk ikunu miġjuba f'din il-kategorija minn kwalunkwe skemi tat-testijiet ta' l-Anness 2, ibbazati fuq l-inċidenti tal-mortalità;
- b) jekk evidenza affidabbli diġà tkun disponibbli li tindika li l-LD₅₀ tkun fil-medda tal-valuri tal-Kategorija 5; jew li studji oħrajn dwar l-annimali jew ta' l-effetti tossiċi fil-bnedmin umani jindikaw thassib għas-saħħa umana ta' natura akuta;
- c) permezz ta' extrapolazzjoni, estimi jew kejl tad-dettalji jekk assenjati għal klassi aktar perikoluża milli misthoqq; u
 - informazzjoni affidabbli kif disponibbli tindika effetti tossiċi sinifikati fil-bnedmin, jew
 - xi mortalità tkun osservata meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4 bir-rotta orali, jew
 - meta ġudizzju minn esperti jikkonferma sinjali kliniċi sinifikanti ta' tossiċità, meta t-test isir sal-valuri tal-Kategorija 4, apparti milli għal dijarrea, piloerezzjoni jew dehra żmattata, jew
 - meta ġudizzju minn esperti jikkonferma li l-informazzjoni affidabbli tindika l-potenzjal għal effetti sinifikament akuti minn studji oħrajn fuq l-annimali.

TESTIJET F'DOŽI OGHĠA MINN 2 000 MG/KG

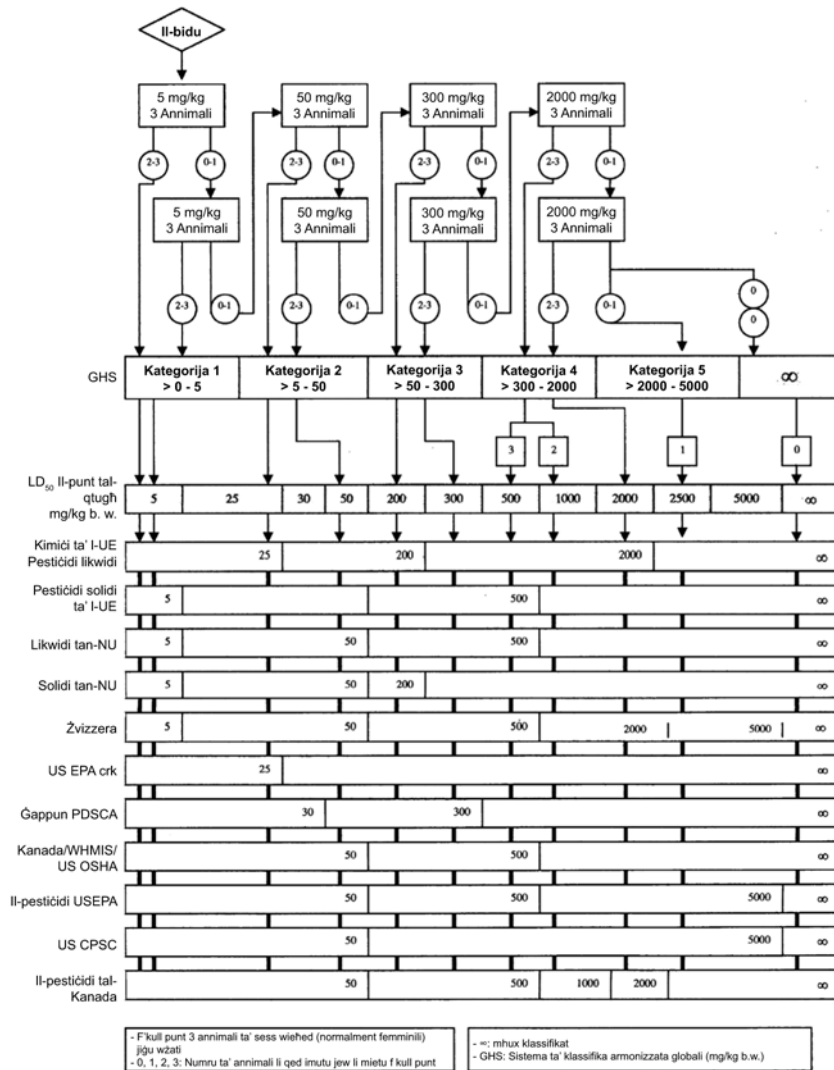
Bir-rikonossiment tal-htieġa li jkun imħares il-ġid ta' l-annimali, testijiet fi 5 000 mg/kg huma skurraġiti u għandhom biss ikunu kkunsidrati meta jkun hemm possibbiltà qawwija li r-riżultati minn test bħal dan ikollu relevanza diretta għall-protezzjoni tas-saħħa ta' l-annimali jew dik umana (10). L-ebda aktar testijiet m'għandhom ikunu mwettqa fil-livelli tad-doži aktar għoljin.

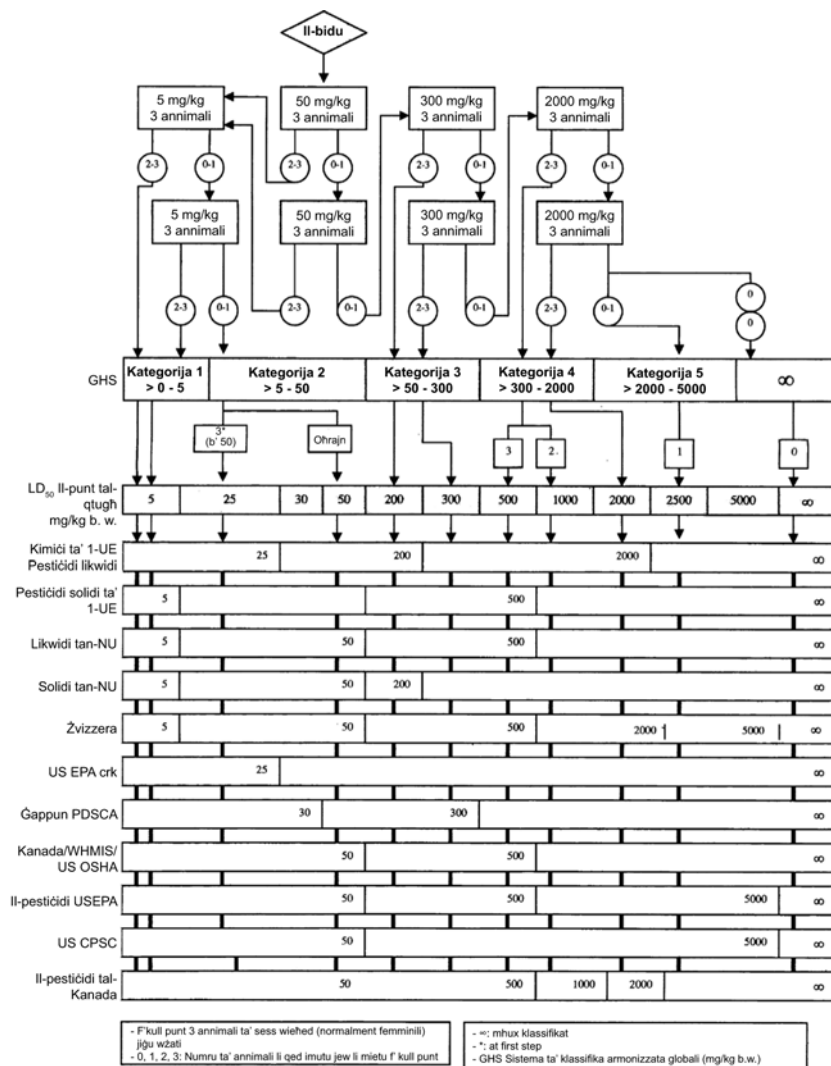
Meta t-testijiet ikunu jehtieġu doża ta' 5 000 mg/kg, il-pass wiehded biss (i.e. tliet annimali) huwa mehtieġ. Jekk l-ewwel annimal li jkun ingħata d-doża, imut, allura l-ghoti tad-doži għandu jipproċedi fi 2 000 mg/kg skond il-*flow chart* fl-Anness 1. Jekk l-ewwel annimal jibqa' ħaj, żewġ annimali oħrajn għandhom jingħataw id-doża. Jekk wiehded biss mit-tliet annimali jmut, il-valur LD₅₀ huwa mistenni li jeċċedi 5 000 mg/kg. Jekk żewġ annimali jmut, allura d-doża ttipproċedi fi 2 000 mg/kg.



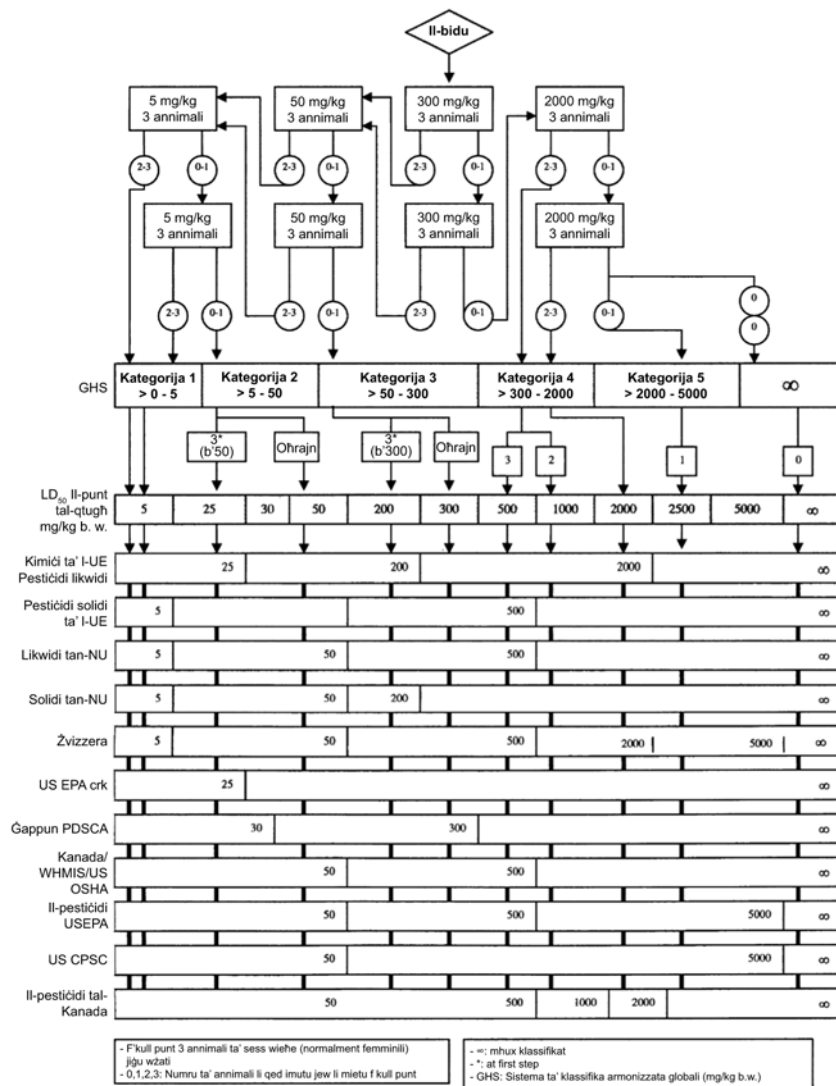
ANNEX 3

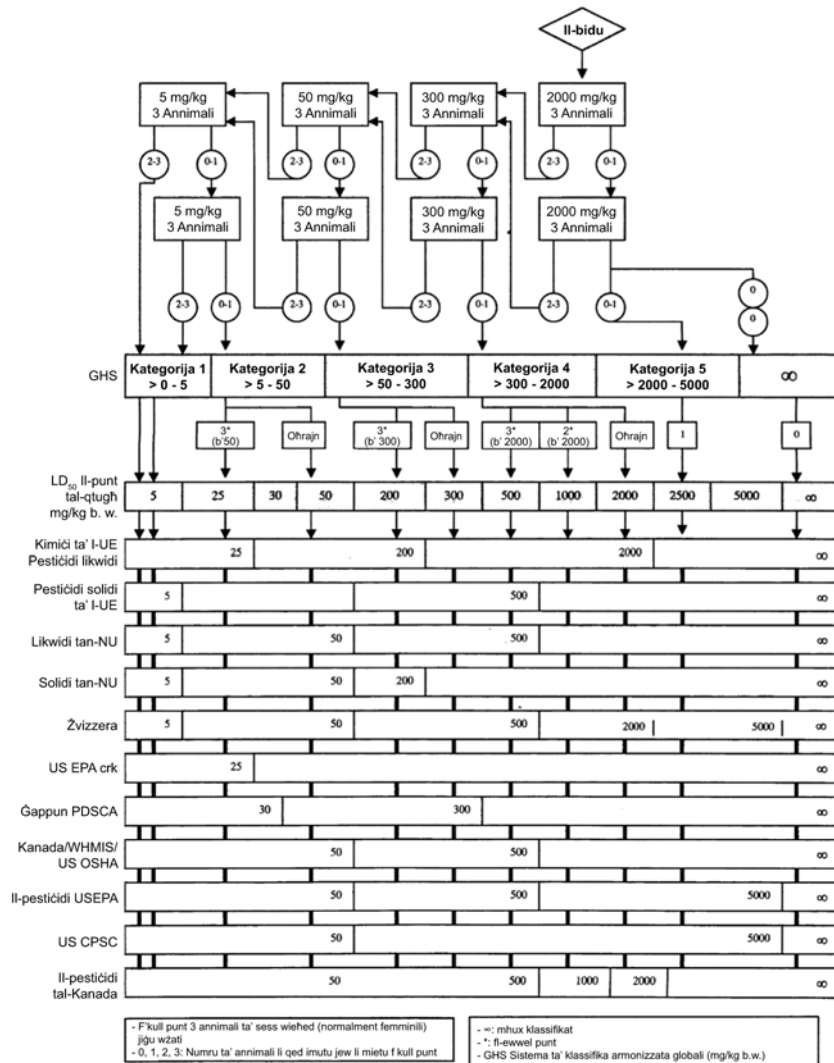
B1c. METODU TAT-TEST Gwida dwar il-klassifika skond l-iskema UE li tkopri l-perjodu transitorju sakemm ikun hemm l-implementazzjoni shiha tas-Sistema ta' Klassifika Armonizzata Globali (GHS) (mehuda minn referenza (8))



▼ B

▼ B



▼ B

▼M4

B.2. TOSSICITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA

DAHLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti ghal-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 htigijiet regolatorji. Il-Metodu ta' Ttestjar rivedut fih żewġ tipi ta' studji: protokoll Tradizzjonali LC₅₀ 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 jagħti konċentrazzjoni letali medjana (LC₅₀), livell limitu ta' konċentrazzjoni mhux letali (eż. LC01), u angolu, u biex possibbilment jidentifika suxxettibbiltà sesswali. Il-Protokoll C × t għandu jintuza meta jkun hemm htieġa 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 ipplanar 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-Tossicità 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 mahsub speċifikatament għall-ittestjar ta' materjali speċjalizzati, bħal materjali isometriċi jew fibrużi li fliet 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, inkluzi 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-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossicità *in vitro* jew *in vivo*; l-użijiet mistennija u l-potenzjal għal espożizzjoni umana; id-dejta (Q)SAR disponibbli u d-dejta tossikoloġika dwar sustanzi strutturalment relatati [ara GD 39 (2)].

▼ M4

6. L-ittestjar ta' kimiċi għall-ittestjar, korrużivi u/jew irritanti f'konċentrazzjonijiet li jkunu mistennija jikkawżaw uġigh sever u/jew diffikultà għandu jkun evitat kemm jista' jkun possibbli. Il-potenzjal korrużiv/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 korrużivi/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 htigijiet regolatorji speċifiċi (eż. għal skopijiet ta' ippanjar 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-konċentrazzjonijiet fil-mira. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet immirati ma għandhomx jiġġeneraw effetti ta' irritazzjoni/korrużivi severi, izda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilhqgħu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jingħazlu 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-lealtà (eż. LC₅₀, LC₀₁ u l-angolu) għal wiehed jew għaž-żewġ sessi kif mehtieg 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 tehid tad-deċiżjoni li annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu hafna jinqatlu, u gwida dwar ir-rikonossiment ta' mewta prevedibbli jew imminenti, huma s-sugġett 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 żgħażaġh 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 żgħażaġh ta' bejn 8 u 12-il ġimgha, u li jkunu jiżnu madwar ± 20 % tal-piż medju għal kull sess ta' kwalunkwe animal 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, minhabba li dan inaqqas it-tensjoni kkawżata bl-introduzzjoni għall-ambjent il-ġdid.

▼ M4

Trobbija tal-annimali

11. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva għandha idealment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, għalkemm dan jista' ma jkunx possibbli meta jintuża l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali generalment għandhom jitqiegħdu f'gagġa fi gruppi skont is-sess u l-koncentrazzjoni, iżda l-ghadd ta' annimali għal kull gagġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull animal u għandu jimminimizza t-telf minhabba l-kannibalizmu u l-ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieher biss, jista' jkun jehtigilhom jidraw it-tubi ta' trazzin. It-tubi ta' trazzin m'għandhomx jimponu tensjoni fizika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trazzin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fizjoloġici bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusku. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li l-eċċidju bidliet bħal dawn ma jseħhu sa kwalunkwe limitu konsiderevoli, f'dak il-kaz ma jkunx mehtieg adattament minn qabel għat-tubi ta' trazzin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jithallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' shabhom fil-gagġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċertifikati mil-laboratorju, hlief matul l-espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb municipali. 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-ghan tat-test għandhom jitqiesu fl-ghazla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-mod preferut ta' espożizzjoni huwa mill-imnieher biss (liema frazi tinkludi r-ras biss, l-imnieher biss jew il-geċċum biss). Espożizzjoni mill-imnieher biss hija generalment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jiffirma 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-imnieher biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma deskritti f'GD 39 (2).

KONDIZZJONIJET TA' ESPOŻIZZJONI**Amministrazzjoni ta' konċentrazzjonijiet**

13. L-espożizzjonijiet mill-imnieher biss jistgħu jkunu ta' kwalunkwe durata sa 6 sigħat għall-firien. Jekk il-grieden ikunu esposti mill-imnieher biss, l-espożizzjonijiet generalment m'għandhomx ikunu itwal minn 4 sigħat. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk ikunu mehtieġa studji li jdumu aktar [ara GD 39 (2)]. L-annimali esposti għall-aerosols fi kmamar għall-ġisem kollu għandhom jingħalqu individwalment biex ma jithallewx jibilghu kimika għall-ittestjar minhabba t-tindif ta' shabhom fil-gagġa. 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 tahlita tagħhom. L-istat fiziku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fizika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immaniġġar u l-użu tal-kimika għall-ittestjar. Il-kimiċi għall-ittestjar igroskopiku u reattivi kimikament għandhom ikunu ttestjati f'kundizzjonijiet ta' arja xotta. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet li jistgħu jisplodu.

▼ **M4****Distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli**

15. It-teħid tad-daqs tal-particelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jiffirma l-aerosols. Biex jithalla 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 jinghata ġudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, id-dhahen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u l-particelli, fibri u materjali igroskopiċi mimlijin (li jikbru fid-daqs fl-ambjent niedi tas-sistema respiratorja) jistgħu jaqbuż dan l-istandard.

Preparazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'vejjikolu

16. Jista' jintuża vejjikolu biex jiġġenera konċentrazzjoni u daqs ta' particelli xierqa tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera. Bħala regola, l-ilma għandu jinghata preferenza. Il-materjal tal-particelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex tinkiseb id-distribuzzjoni tad-daqs meħtieġ ta' particelli, iżda, għandha tinghata 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 thin eċċessiv minhabba l-frizzjoni), il-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun ivverifikata b'mod analitiku. Għandha tinghata attenzjoni adegwata biex il-kimika għall-ittestjar ma tkunx ikkontaminata. Mhux meħtieġ li jkunu ttestjati materjali granulari li ma jizzartux li jkunu fformulati apposta biex ma jkunx jistgħu jittieħdu man-nifs. Għandu jintuża test ta' attrizzjoni biex jintwera li particelli li jistgħu jittieħdu man-nifs ma jkunx prodotti meta jintmiss il-materjal granulari. Jekk test ta' attrizzjoni jipproduċi sustanzi li jistgħu jittieħdu man-nifs, għandu jsir test għat-tossicità 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' tossicità man-nifs. Jekk studju dwar it-tossicità ta' kimika għall-ittestjar ifformulata f'vejjikolu ma juri ebda tossicità, isegwi li l-vejjikolu ma jkunx tossiku fil-konċentrazzjoni ttestjata; għalhekk ma jkunx meħtieġ kontroll ta' vejjikolu.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJET TA' ESPOŻIZZJONI**Fluss tal-arja fil-kamra**

18. Il-fluss tal-arja mal-kamra għandu jkun ikkontrollat sewwa, immonitorjat kontinwament u reġistrat 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 tinghata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata inalazzjoni mill-ġdid fi kmamar għall-immieher biss f'każijiet fejn fluxx tal-arja mis-sistema ta' espożizzjoni ma jkunx adegwat biex jipprovdi fluxx 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-ossigenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wiehed jemmin li dawn l-istandards ma jkunx jistgħu jintlaħqu, il-konċentrazzjonijiet tal-ossigenu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu.

▼ M4

Temperatura tal-kamra u umdità relattiva

19. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għal 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-żona fejn l-annimali jiehdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieher biss kif ukoll mill-gisem 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 tahlitiet ibbażati fl-ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minhabba 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 gġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkarakterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda paragon tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali jagħti indikazzjoni tal-effiċjenza tal-generazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, jista' jintuża biex jiżvela problemi ta' generazzjoni.

Kimika għall-ittestjar: Konċentrazzjoni attwali

21. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fiż-żona fejn l-annimali jiehdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu b'metodi speċifiċi (eż. tehid dirett ta' kampjun, 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' volatilittà 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'analizi gravimetrika. Iżda din tehtiegħ 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 mehtieġa analiżi mill-gdid 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 jissublimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha ngabru 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 jinbada 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: hin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-oghla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimuli 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 prattikabbilmment kostanti u tkun immonitorjata kontinwament u/jew f'intervalli skont il-metodu ta' analiżi. Meta jittiehed kampjun f'intervalli, il-kampjuni tal-atmosfera tal-kamra għandhom jittiehdu mill-anqas darbtejn għal studju ta' erba' sigħat. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minhabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew konċentrazzjonijiet baxxi, jista' jingabar kampjun wieħed tul il-perjodu kollu ta' espożizzjoni. Jekk isehh caqliq minn kampjun għal

▼ M4

kampjun, il-konċentrazzjonijiet ittestjati li jkun imiss għandhom jużaw erba' kampjuni għal kull espożizzjoni. Kampjuni individwali ta' konċentrazzjonijiet tal-kamra m'għandhomx jiddevjaw mill-konċentrazzjoni medja b'aktar minn $\pm 10\%$ għall-gassijiet u l-fwar jew $\pm 20\%$ għal aerosols likwidi jew solidi. L-ekwilibrizzjoni ta' hin ma' kamra (t_{95}) għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-hin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata u din tqis il-hinijiet mehtieġa biex jinkiseb t_{95} . Il-gwida għall-istima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (2).

24. Għal tahlitiet kumplessi hafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar, u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imhaddmin minn prodott/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-tahlita, ta' kull fażi (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun tahlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-tahlita 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-ghodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-partiċelli. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-rizultati 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-gbir. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi tad-daqs tal-partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi b'filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-faži bikrija tal-istudju, f'dak il-każ il-kejl jista' jkun konferma ulterjuri jistgħu jithallew barra. Għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittieħdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal htieġa ta' ripetizzjoni ta' espożizzjoni. It-tehd 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 imhallta (ara l-paragrafu 15).

PROCEDURA

26. Żewġ tipi ta' studji huma deskritti hawn taħt: il-protokoll Tradizzjonali u l-protokoll $C \times t$. Iż-żewġ protokoll jistgħu jinkludu studju ta' osservazzjoni, studju ewlieni, u/jew test ta' limitu (protokoll Tradizzjonali) jew ittestjar f'konċentrazzjoni limitata ($C \times t$). Jekk ikun magħruf li wieħed miż-żewġ sessi jkun aktar suxxettibbli, id-direttur tal-istudju jista' jagħzel li jwettaq dawn l-istudji billi juża biss is-sess suxxettibbli. Jekk speċijiet ta' rodituri minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieher 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-htieġa ta' studju ta' osservazzjoni, u tista' wkoll turi jekk wieħed miż-żewġ sessi jkunx aktar suxxettibbli [ara GD 39 (2)].

▼M4

PROTOKOLL TRADIZZJONALI

Konsiderazzjonijiet generali: Protokoll tradizzjonali

27. Fi studju tradizzjonali, il-gruppi ta' annimali jkunu esposti għal kimika għall-ittestjar għal perjodu fiss ta' żmien (generalment 4 sigħat) f'kamra tal-espożizzjoni mill-imnieher biss jew mill-gisem 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-ghażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni ta' espożizzjoni għall-istudju ewlieni jew għat-test tal-limitu. Meta tkun qed issir l-ghażla 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 htieġa ta' 3 annimali/sess biex tkun stabbilita d-differenza sesswali). Studju ta' osservazzjoni jista' jikkonsisti f'konċentrazzjoni waħda, izda 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 wiehed ta' tliet irġiel u tliet nisa jkun espost għall-kimika għall-ittestjar f'konċentrazzjoni limitata. L-informazzjoni dwar it-tossicità 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-tossicità tagħha, jew fejn il-kimika għall-ittestjar hija mistennija li tkun tossika, għandu jsir it-test ewlieni.
30. L-ghażla 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-ghan primarju għandu jkun li jinkiseb daqs ta' partiċelli li jkun jista' jittehd 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' jittiehd 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-saħha tal-bniedem (3), u tingħata ġustifikazzjoni fir-rapport ta' studju. Fil-każ ta' kimiċi għall-ittestjar potenzjalment esplożivi, għandha tingħata attenzjoni biex ikunu evitati kundizzjonijiet favorevoli għal splużjoni. Biex ikun evitat l-użu mhux meħtieġ tal-annimali, għandu jsir test ta' prova mingħajr l-annimali qabel it-test ta' limitu sabiex ikun żgurat li l-kundizzjonijiet tal-kamra għat-test ta' limitu jkunu jistgħu jinkisbu.

▼ M4

31. Jekk ikunu osservati mortalità jew annimali moribondi fil-konċentrazzjoni limitata, ir-riżultati tat-test ta' limitu jistgħu jservu bħala studju ta' osservazzjoni għal ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet ohra (ara l-istudju ewlieni). Jekk il-proprietajiet 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 mehtieg 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 mehtieg li tkun iġġenerata kimika għall-ittestjar bħala aerosol likwidu.

Studju ewlieni: Protokoll tradizzjonali

32. Studju ewlieni tipikament isir billi jintużaw hames irġiel u hames 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 tithalla 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. Minhabba 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-tahlitiet.

PROTOKOLL TAL-KONĊENTRAZZJONI X HIN ($C \times T$)**Konsiderazzjonijiet ġenerali: Protokoll $C \times t$**

33. Studju $C \times t$ 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-imnieher biss (kmamar għall-ġisem kollu mhumix prattiki għal dan il-protokoll). Dijagramma tal-fluss tagħti illustrazzjoni ta' dan il-protokoll fl-Appendiċi 1. Analizi ta' simulazzjoni wriet li l-protokoll Tradizzjonali u l-protokoll $C \times t$ it-tnejn huma kapaċi jrendu valuri robusti ta' LC_{50} , iżda l-protokoll $C \times t$ huwa ġeneralment aħjar biex irendi valuri robusti ta' LC_{01} u LC_{10} (15).
34. Analizi ta' simulazzjoni wriet li l-użu ta' żewġ annimali għal kull intervall ta' $C \times t$ (wiehed 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 $C \times t$ (15). L-użu ta' 2 annimali għal kull sess għal kull konċentrazzjoni u punt ta' hin 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 ezatt mad-dejta għall-istima (meta jintuża animal wiehed għal kull sess jew żewġ annimali tas-sess l-aktar suxxettibbli) tista' wkoll tkun bizżejjed il-hames (5) espożizzjoni ta' konċentrazzjoni. Gwida ulterjuri dwar l-ghadd ta' annimali u konċentrazzjonijiet li għandhom jintużaw fi studju $C \times t$ tinsab f'GD 39 (2).

▼ M4

Studju ta' osservazzjoni: Protokoll C × t

35. Studju ta' osservazzjoni jintuża biex tkun stmata l-qawwa ta' kimika għall-ittestjar u biex jassisti fl-għażla tal-livelli ta' konċentrazzjoni ta' espożizzjoni għall-istudju ewlieni. Jista' jkun mehtieg studju ta' osservazzjoni li juża sa tliet annimali/sess/konċentrazzjoni [għad-dettalji ara l-Appendiċi III ta' GD 39 (2)] biex tintgħazel il-konċentrazzjoni tal-bidu adattata għall-istudju ewlieni u biex ikun imminimizzat l-għadd ta' annimali użati. Jista' jkun mehtieg 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 mehtieg 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 wiehed/sess wiehed 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 (msejha 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' jittiehed man-nifs (jiġifieri MMAD ta' 1-4 µm) f'konċentrazzjoni limitata ta' 2 mg/l. Dan huwa possibbli b'hafna 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' jittiehed 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-ittestjar 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 mehtieg 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 ohra (ara l-istudju ewlieni). Meta l-proprietajiet 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 mehtieg aktar ittestjar. Jekk il-konċentrazzjoni limitata ma' kinitx tista' tinkiseb, ir-rapport ta' studju għandu jipprovi spjegazzjoni u dejta ta' sostenn. Jekk il-konċentrazzjoni massima li tista' tinkiseb ta' fwar ma tislitx tossiċità, jista' jkun mehtieg li tkun iġġenerata kimika għall-ittestjar bħala aerosol likwidu.

▼M4

Studju ewlieni: Protokoll $C \times t$

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 tkun għet osservata mortalità matul jew wara s-Sessjoni ta' Espożizzjoni I, l-espożizzjoni minima ($C \times t$) li tirriżulta f'mortalità tittiehed bħala gwida biex tkun stabbilita 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 hafna kimiċi għall-ittestjar ir-riżultati miksubin fil-konċentrazzjoni inizjali, flimkien ma' tliet sessjonijiet ta' espożizzjoni addizzjonali b'distribuzzjoni anqas ta' hin (jiġifieri l-ispazjar ġeometriku ta' perjodi ta' espożizzjoni kif indikat mill-fattur bejn perjodi suċċessivi, ġeneralment $\sqrt{2}$), għandhom ikunu suffiċjenti biex tkun stabbilita r-relazzjoni ta' mortalità $C \times t$ (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 $C \times t$, 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 miżmien 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'kundizzjoni moribonda u annimali li juru uġiġh 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 f'tit għall-bidu u jkun hemm bidliet respiratorji li jgħaddu malajr, li jiġu minn proċedura ta' espożizzjoni, wiehed ma jihux zball 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' Tmieni b'Mod Uman (GD 19) (7). Meta l-annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-hin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.
42. L-osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-gilda u l-pil, l-għajnejn u l-membrani mukużi, u wkoll fis-sistema respiratorja, ċirkulatorja, awtonomika u nervuża centrali, u fl-attività somatomotorja u x-xejriet ta' mġiba. Meta jkun possibbli, għandha tkun innotata kull divrenzazzjoni bejn l-effetti lokali u sistemiċi. L-attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' treġhid, konvulzjonijiet, 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-hin tal-mewt jew ewtanazja jekk jaqbz u l-ewwel (1) jum. Il-piż tal-ġisem huwa rikonossut 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 haġġin jintiżnu u jinqatlu b'mod uman fi tmieni il-perjodu ta' wara l-espożizzjoni.

▼ **M4****Patoloġija**

44. L-annimali kollha tat-test, inkluzi dawk li jmutu matul it-test jew li jinqatlu bl-ewtanasje u jitnehhew 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 jitkessah (mhux iffriżat) f'temperaturi baxxi biżżejjed biex tkun imminimizzata l-awtolizi. L-awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopici kollha għandhom jiġu rreġistrati għal kull annimal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.
45. L-eżamijiet addizzjonali inkluzi a priori dawk imfasslin apposta jistgħu jitqiesu li jestendu l-valur interpretattiv tal-istudju, bħall-kejl tal-piż tal-pulmun ta' frien li jkunu baqgħu haġġin, 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 igroskopici għall-ittestjar.

DEJTA U RAPPORTAR**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 tingabar fil-qosor f'forma tabulari, li turi għal kull grupp tat-test l-ghadd ta' annimali użati, l-ghadd ta' annimali li jkunu wrew sinjali specifici ta' tossiċità, l-ghadd ta' annimali li jkunu nstabu mejta matul it-test jew li jkunu nqatlu għal raġunijiet umani, il-hin tal-mewt ta' annimali individwali, deskrizzjoni u kemm jiehdu 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, inkluz: l-ghadd (jew bidla fl-ghadd) 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;
- Ghadd, età u sess tal-annimali;
- Metodu ta' każwalità;
- Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluz tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma);
- Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test, inkluzi dieta, kwarantina u trattament għall-mard;

▼ **M4***Kimika għall-ittestjar*

- Natura fiżika, purezza u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fizikokimiċi (inkluża l-isomerizzazzjoni);
- Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Registru 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-particelli 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 omogenea tat-test;
- Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva);
- Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieher biss); tqeghid tal-annimali fis-sistema (il-ġisem kollu);
- Omogeneità/stabbiltà temporali tal-atmosfera tat-test;
- Post tas-sensuri tat-temperatura u tal-umdità u tehid ta' kampjuni tal-atmosfera tat-test fil-kamra;
- Rati tal-fluss tal-arja, rata tal-fluss tal-arja/port ta' espożizzjoni (imnieher biss), jew toqol tal-annimali/kamra (il-ġisem kollu);
- Informazzjoni dwar it-tagħmir użat għall-kejl tal-ossigenu u tad-dijossidu tal-karbonju, jekk applikabbli;
- Hin meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t_{95});
- Ghadd 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-zona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal tahlitiet li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament;

▼ **M4**

- Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrappurtati f'unitajiet ta' massa (eż. mg/l, mg/m³, 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 (σ), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Għandha tkun irrappurtata analiżi wahda 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'kazijiet 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-tehid 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' għbir 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);
- Pizijiet tal-ġisem individwali tal-annimali miġburin għall-istudju; data u hin tal-mewt jekk qabel l-ewwtanasja skedata, kemm ikun għadda żmien minn meta faqqgħu s-sinjali tat-tossiċità u jekk dawn kinux reversibbli għal kull annimal;
- Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull annimal, jekk disponibbli;
- Stimuli tal-lealtà (eż. LC₅₀, LD₀₁) 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-sofwer tal-istatistika użat;

▼ **M4***Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati*

- Għandha ssir enfazi 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 jiġiharsu;
- Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm hteġa 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 probabbli tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistema 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 jhassar 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, Tossicità ta' Inalazzjoni Akuta - Metodu ta' Klassi Akuta Tossika (ATC).
- (5) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness: Korruzzjoni tal-Gilda In Vitro: Test ta' Reżistenza Elettrika Transkutanea (TER).
- (6) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, Korruzzjoni tal-Gilda In Vitro: Test Mudell tal-Gilda Umana.
- (7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.
- (10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼M4

- (11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.
- (12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278-290.
- (13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105-117.
- (14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65-71.
- (15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and $C \times t$ 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 tahlita ttestjata bl-użu ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

▼ M4

Appendiċi 1

Protokoll C × t

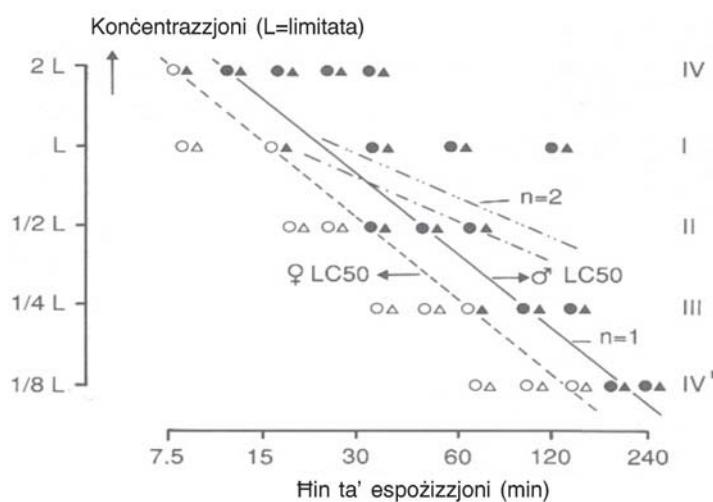
1. Jista' jitqies studju pass pass ta' Konċentrazzjoni × Hin (C × t) bħala alternattiva għall-protokoll Tradizzjonali biex tkun ivvalutata t-tossiċità tal-inalazzjoni (12) (13) (14). Dan għandu jsir b'mod preferenzjalment meta jkun hemm hteġa regolatorja jew xjentifika speċifika li ssejjaħ għall-ittestjar ta' annimali tul durati multipli ta' zmien bħal ta' ppjanar ta' rispons għal emergenza 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 hames durati ta' hin (eż. 15, 30, 60, 120 u 240 minuta) biex id-durati multipli ta' hin jinkisbu f'Sessjoni ta' Espożizzjoni wahda (ara l-Figura 1). Meta jintuza 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 hteġa 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 fit 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, generalment 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 hteġa ta' ttestjar addizzjonali. Jekk ikun hemm hteġa regolatorja jew xjentifika biex tkun stabbiltà r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni/hin/rispons f'livelli oghla mill-konċentrazzjoni limitata indikata, l-espożizzjoni li jkun immiss għandha ssir f'livell oghla bħall-konċentrazzjoni limitata għal darbtejn (jiġifieri 2L fil-Figura 1).
4. Jekk tkun osservata t-tossiċità fil-konċentrazzjoni limitata, ikun mehtieg 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 oghla 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 jintuza animal wiehed/sess wiehed għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin jew b'2 annimali tas-sess aktar suxxettibbli għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin. F'xi ċirkostanzi, id-direttur tal-istudju jista' jagħżel li jutilizza 2 frien għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin (jew 4 annimali tas-sess suxxettibbli għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin) (15). L-użu ta' 2 annimali għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin generalment inaqqas mill-parzjalità u mill-varjabbiltà tal-istimi, iżid ir-rata ta' suċċess ta' stimuli, 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 wiehed. Dan jagħti l-opportunità biex l-espożizzjoni li jkun immiss tithalla 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 immiss. Qed jiġi rrakkomandat li kull sessjoni ta' espożizzjoni tinbeda mal-grupp li se jkun espost l-izjed fit-tul, jiġifieri l-grupp ta' espożizzjoni ta' 240 minuta, warajh il-grupp ta' espożizzjoni ta' 120 minuta, eċċ. Jekk, pereżempju, l-annimali fil-grupp tal-240 minuta jibdew imutu wara 90 minuta jew juru sinjali severi ta' tossiċità (eż. tibidl estrem fix-xjera tat-tehid tan-nifs bħal nifs bi tbaġhtija), ma jagħmilx sens li grupp jiġi espost għal 120 minuta għaliex il-mortalità proabbilment tkun 100 %. Għalhekk id-direttur tal-istudju għandu jagħżel durati iqsar ta' espożizzjoni għal dik il-konċentrazzjoni (eż. 90, 65, 45, 33 u 25 minuta).

▼ M4

7. Il-konċentrazzjoni tal-kamra għandha titkejjel ta' spiss biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni medja peżata mal-hin għal kull perjodu ta' espożizzjoni. Kull meta jkun possibbli, għandu jintuża l-hin tal-mewt ta' kull annimal (iktar milli d-durata ta' espożizzjoni) fl-analiżi ta' statistika.
8. Ir-rizultati tal-ewwel erba' sessjonijiet ta' espożizzjoni għandhom ikunu eżaminati biex tkun identifikata differenza fid-dejta fil-kurva ta' konċentrazzjoni-hin (ara l-Figura 1). F'każ li ma jkunx hemm qbil biżżejjed, tkun tista' ssir espożizzjoni addizzjonali (il-hames (5) konċentrazzjoni). Għandhom jintgħażlu durati ta' konċentrazzjoni u espożizzjoni għall-hames 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-hin-rispons billi tintuża Analizi ta' Statistika (16). Jekk ikun possibbli, għal kull intervall $C \times t$, għandhom jintużaw il-konċentrazzjoni medja peżata mal-hin u d-durata ta' espożizzjoni sal-mewt (jekk il-mewt issehh matul l-espożizzjoni).

Figura 1

Illustrazzjoni ipotetika tar-relazzjoni ta' konċentrazzjoni-hin-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:

Hin ta' espożizzjoni:

▼ M4

10. Hawn taht hawn eżempju tal-proċedura pass pass:

Sessjoni ta' Espożizzjoni I – Ittestjar fil-konċentrazzjoni limitata (ara l-Figura 1)

- 1 animal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin; total ^(a)
- Konċentrazzjoni ^(b) = konċentrazzjoni limitata.
- Esponi hames 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 animal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin; total ta' 10 annimali.
- Esponi hames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni ^(d) (1/2L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur $\sqrt{2}$ spazjat; ara l-Figura 1).

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni III – Studju Ewlieni

- 1 animal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin; total ta' 10 annimali.
- Esponi hames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni ^(d) (1/4L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur $\sqrt{2}$ spazjat; ara l-Figura 1).

↓

Sessjoni ta' Espożizzjoni IV' – Studju Ewlieni

- 1 animal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin; total ta' 10 annimali.
- Esponi hames gruppi ta' annimali f'konċentrazzjoni ^(d) (1/8L) b'durati ta' espożizzjoni ftit itwal (fattur $\sqrt{2}$ spazjat; ara l-Figura 1).

↓ jew

^(a) Jekk ma tkunx disponibbli informazzjoni dwar is-suxxettibbiltà tas-sessi, jintużaw frien taz-żewġ sessi, jiġifieri animal wiehed/sess wiehed 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-iehor, għandhom jintużaw 10 annimali mis-sess suxxettibbli (2 annimali għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin) 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 jintgħazlu konċentrazzjonijiet tal-bidu aktar baxxi. F'każ ta' htigijiet regolatorji jew xjentifiċi, jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet oghla. mmirata

^(c) Idealment, l-espożizzjoni tal-annimali fil-livell ta' konċentrazzjoni li jkun imiss għandha ssir aktar tard sakemm ikun hemm kunfidenza raġonevoli ta' sopravivenza għal annimali li jkunu ġew ittrattati qabel. Dan jippermetti lid-direttur tal-istudju jaġġusta l-konċentrazzjoni mmirata u d-durati għas-sessjoni ta' espożizzjoni li tkun imiss.

^(d) Id-doża minima (konċentrazzjoni $\times$ hin) li tkun irriżultat f'mortalità matul l-ittestjar fil-konċentrazzjoni inizzjali (l-ewwel sessjoni ta' espożizzjoni) tittiehed bħala gwida biex tkun stabbilita t-tahlita 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' hin b'grid iktar fina li tuża diviżjoni ġeometrika ta' perjodi ta' espożizzjoni b'fattur ta' 1.4 ($\sqrt{2}$; ara r-referenza 11) matul il-hin skont il-livell minimu tad-doża letali (hin $\times$ konċentrazzjoni) 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 hafna li d-dejta titfassal f'mod simili kif indikat hawn fuq, u li jkun ivverifikat jekk ir-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-hin ikollhiex angolu ta' 45 grad (n = 1) jew jekk ir-relazzjoni ta' konċentrazzjoni-hin-rispons tkunx anqas wieqfa (eż. n = 2) jew aktar wieqfa (eż. n = 0,8). Fil-każijiet tal-ahhar huwa rrakkomandat hafna li l-konċentrazzjonijiet u d-durati li jkun imiss ikunu adattati bl-istess mod. aktar baxxa

▼ **M4****Sessjoni ta' Espożizzjoni IV – Studju Ewlieni**

- 1 animal għal kull sess għal kull konċentrazzjoni/punt ta' hin; total ta' 10 animali.
- Esponi hames gruppi ta' animali f'konċentrazzjoni ^(e) (2L) b'durati ta' espożizzjoni ftit aqsar (fattur $\sqrt{2}$ spazjat; ara l-Figura 1).

Trattament matematiku tar-riżultati għall-protokoll $C \times t$

11. Il-proċedura ta' $C \times t$ b'4 jew 5 konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni u hames durati trendi 20 jew 25 punt ta' dejta, rispettivament. B'dawn il-punti ta' dejta, ir-relazzjoni $C \times t$ tista' tkun ikkalkulata billi tintuża analiżi ta' statistika (16):

Ekwazzjoni 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

fejn C = konċentrazzjoni; t = perjodu ta' espożizzjoni, jew

Ekwazzjoni 2:

$$\text{Reazzjoni} = f(C^n t)$$

fejn $n = b_1/b_2$.

Bl-użu tal-ekwazzjoni 1, jista' jkun ikkalkulat il-valur LC_{50} għal perjodu ta' hin partikolari (eż. 4 sigħat, siegħa 1, 30 minuta, jew kwalunkwe perjodu fil-firxa ta' perjodi ta' hin ittestjati) bl-użu ta' $P = 5$ (50 % rispons). Innota li r-regola ta' Haber tapplika biss meta $n = 1$. LC_{01} jista' jkun ikkalkulat bl-użu ta' $P = 2,67$.

^(e) F'ċerti każijiet jista' jkun meħtieġ li l-konċentrazzjoni tiżdied (2L) tul firxa għida ta' hin bi grid terġa aktar fina bl-użu ta' diviżjoni ġeometrika ta' perjodi ta' espożizzjoni b'fattur ta' 1.4 ($\sqrt{2}$) f'dak il-hin skont il-livell minimu tal-konċentrazzjoni letali osservat matul l-ewwel espożizzjoni. Id-durata minima ta' espożizzjoni għandha preferibbilment tkun aktar minn 5 minuti; id-durata massima ta' espożizzjoni m'għandhiex tkun aktar minn 8 sigħat."

▼B**B.3. TOSSICITÀ AKUTA (DERMALI)****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (A).

1.2. DEFINIZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (B).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test tiġi applikata fuq il-ġilda f'dozi ggradwati lil bosta gruppi ta' annimali sperimentali, doża waħda użata għal kull grupp. Sussegwentement, isiru l-osservazzjonijiet ta' l-effetti u ta' l-imwiet. L-annimali, li jmutu waqt it-test issirihom inniekropsija u fl-aħħar tat-test din issir fuq dawk l-annimali li baqghu hajjin.

Jista' jagħti l-każ li l-annimali li juru sinjali gravi u li jtulu ta' tbatija u uġiġh jinqatlu b'mod uman. Is-sustanzi għat-test f'dożagġi magħrufa li jikkawżaw l-uġiġh u t-tbatija minhabba proprjetajiet korrużivi jew ta' irritazzjoni m'għandhomx għalfejn jitwettqu.

1.5. KRITERJI TAL-KWALITÀ

Xejn

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**1.6.1. Preparazzjonijiet**

L-annimali huma miżmuma f'fondi sperimentali u f'kundizzjonijiet ta' l-ghalf għal mill-anqas hamest ijiem qabel l-esperiment. Qabel it-test, annimali adulti zgħażaġh b'saħħithom huma magħzula b'mod kif jinzerta u assenjati lejn gruppi għat-trattament. Xi ftit qabel it-testijiet, il-pil huwa maqtugħ miż-zona dorsali tad-dahar ta' l-annimali tat-test. It-tqaxxir jista' jkun użat imma għandu jkun imwettaq madwar 24 siegħa qabel it-test. Meta jsir il-qtugħ jew it-tqaxxir tal-pil, kura għandha tittiehed sabiex ikun evitat xi grif fil-ġilda li jkunu jistgħu jibdlu l-permeabbiltà tagħha. Mhux anqas minn 10 % tal-wieċ tal-ġisem għandu jkun imnaddaf għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Meta jsiru testijiet tas-solidi, li jistgħu ikunu pulverizzati jekk xieraq, is-sustanza tat-test għandha tkun b'umidità suffiċjenti bl-ilma, jew, meta meħtieġ, apparat adattat sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Meta jiġi użat xi mezz, għandha tiġi kkunsidrata l-influwenza tiegħu fuq il-penetrazzjoni tal-ġilda bis-sustanza għat-test. Is-sustanzi għat-test likwidi ġeneralment jintużaw mhux mahlula.

1.6.2. Kundizzjonijiet tat-test**1.6.2.1. Annimali sperimentali**

Firien jew fniek, jew fniek ta' l-indi adulti jistgħu jintużaw. Speċje oħrajn jistgħu jiġu użati imma l-użu tagħhom ikun jeħtieġ ġustifikazzjoni. Għandhom jintużaw karatteristiċi tal-laboratorju użati b'mod komuni. Fil-bidu ta' kull test, il-medda tal-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi ± 20 % tal-valur medju kif xieraq.

▼B**1.6.2.2. *Numru u sess.***

Mill-anqas 5 annimali huma użati f'kull livell tad-doża. Iridu jkunu ta' l-istess sess. Jekk jintużaw daww femminili, dawn qatt ma jkunu welldu u mhumiex tqal. Fejn l-informazzjoni hija disponibbli li turi li s-sess partikulari huwa iktar sensitiv, l-annimali ta' dan is-sess għandhom jingħataw id-doża.

Nota: F'testijiet ta' tossiċità akuta b'annimali t'ordni oghla minn tal-gerriema, l-użu ta' numri iżgħar għandu jiġi kkunsidrat. Id-doži għandhom jingħazlu bl-attenzjoni, u għandu jsir kull sforz sabiex id-doži li huma xi ftit tossiċi ma jinqabżux. F'testijiet bħal dawn, l-amministrazzjoni tad-doži letali tas-sustanza għat-test għandha tiġi evitata.

1.6.2.3. *Livelli tad-doża*

Dawn għandhom ikunu biżżejjed bħala numru, mill-inqas tlieta, u spazjati b'mod xieraq sabiex jipproduċu gruppi ta' test b'medda ta' effetti tossiċi u rati ta' mortalità. Kwalunkwe effetti korrużivi jew ta' irritazzjoni għandhom jiġu kkunsidrati meta jiġu deċiżi l-livelli tad-doża. Id-data għandha tkun biżżejjed biex tipproduċi kurva li turi d-doża/ir-rispons u, fejn hu possibbli, tippermetti determinazzjoni aċċettabbli ta' l- LD₅₀

1.6.2.4. *Test ta' limitazzjoni*

Test ta' limitu f'livell wiehed ta' doża ta' mill-inqas 2 000 mg/kg ta' piż tal-ġisem jista' jitwettaq fi gruppi ta' 5 annimali maskili u 5 femminili, bl-użu tal-proċeduri deskritti hawn fuq. Jekk ikun hemm mortalità compound-related jista' jiġi kkunsidrat studju shih.

1.6.2.5. *Perijodu ta' l-Osservazzjoni*

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' mill-inqas 14-il jum. Madankollu, it-tul ta' l-osservazzjoni m'għandux ikun issettjat strettament. Għandu jkun determinat mir-reazzjonijiet tossiċi, ir-rata ta' *onset* tagħhom u t-tul tal-perjodu ta' rkupru, u għalhekk jista' jiġi estiz jekk ikun meħtieġ. Il-hin li fih is-sinjali tat-tossiċità jidhru u jisparixxu, iż-żmien li jiehdu u l-hin tal-mewt huma importanti, speċjalment jekk ikun hemm it-tendenza li jtulu l-imwiet.

1.6.3. *Il-proċedura*

L-annimali għandhom jinżammu f'gagēg individwali. Is-sustanza għat-test għandha tiġi applikata b'mod uniformi fuq zona, li hija bejn wiehed u iehor 10 % taż-zona totali tal-wiċċ tal-ġisem B'sustanzi ferm tossiċi, iż-zona tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas imma kemm jista' jkun miż-zona għandha tkun koperta b'saff irqieq u uniformi kemm jista' jkun possibbli

Matul l-24 siegħa tal-perjodu ta' l-espozizzjoni s-sustanza tat-test tinżamm f'kontatt mal-gilda b'garża poruża u faxxa mhux irritanti. Is-sit tat-test għandu jkun aktar kopert b'mod xieraq sabiex iżomm il-faxxex bil-garża u s-sustanza tat-test u jassiguraw li l-annimali ma jkunux jistgħu jilgħaqu u jieklu s-sustanza tat-test. Restrizzjonijiet jistgħu jintużaw sabiex jipprevjenu l-ingestjoni tas-sustanza tat-test, imma l-immobilizzazzjoni kompleta mhix metodu rakkommandat.

▼B

Fi tmiem il-perjodu ta' l-espozizzjoni, għandhom jitnehhew ir-residwi tas-sustanza għat-test, fejn hu prattikabbli, permezz ta' l-ilma jew xi metodu xieraq iehor ta' tindif tal-gilda.

L-osservazzjonijiet għandhom jiġu rrekordjati sistematikament kif isiru. Ir-rekords individwali għandhom jinżammu għal kull animal. L-osservazzjonijiet għandhom isiru ta' spiss fl-ewwel jum. Ezaminazzjoni klinika bil-galbu għandha ssir mill-inqas darba kull ġurnata ta' xogħol, l-osservazzjonijiet l-oħra għandhom isiru kuljum b'azzjonijiet xierqa sabiex jiġi minimizzat it-telf ta' annimali mill-istudju eż. In-nekropsija jew ir-refriġerazzjoni ta' daww l-annimali li jinstabu mejta u l-iżolament jew il-qtil ta' annimali dgħajfa jew li qed imutu.

L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-gilda u l-pil, fl-għajnejn u membrani mukozji, u anki fis-sistemi respiratorji, ċirkulatorji, awtonomiċi u tas-sistema ċentrali tan-nervituri; l-attività somatomotori u l-istil ta' l-imġiba. Għandha tingħata attenzjoni partikulari għall-osservazzjoni ta' tkexkix, konvulżjonijiet, ir-rieq, dijareja, il-letargija, l-irqad u l-koma. Il-hin tal-mewt għandu jiġi rrekordjat kemm jista' jkun bl-eżatt. L-annimali li jmutu waqt it-test u daww li jibqgħu hajjin fi tmiem it-test huma suġġetti għan-nekropsija. It-tibdil kollu patoloġiku kbir għandu jiġi rrekordjat. Fejn hu indikat, it-tessuti għandhom jittiehdu għall-ezaminazzjoni hispatoloġika.

Valutazzjoni tat-tossicità fis-sess l-iehor.

Wara tmiem l-istudju ta' sess wiehed, mill-inqas grupp wiehed ta' 5 annimali tas-sess l-iehor jingħata d-doża biex jiġi stabbilit li l-annimali ta' dan is-sess mhumiex iktar sensittivi għas-sustanza tat-test. L-użu ta' inqas annimali jista' jkun ġustifikat f'ċirkostanzi individwali. Fejn hemm informazzjoni xierqa disponibbli li turi li l-annimali tas-sess li qed jiġi ttestjat huma iktar sensittivi, l-ittestjar fuq l-annimali tas-sess l-iehor jista' ma jsirx.

2. DATA

Id-data għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, il-hin tal-mewt ta' l-annimali individwali, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali oħra ta' tossicità, id-deskrizzjoni ta' l-effetti tossiċi u s-sejbiet ta' nekropsija. Il-pizijiet individwali ta' l-annimali għandhom jiġu determinati u rrekordjati fl-it qabel is-sustanza għat-test tiġi applikata. Wara, dan isir kull ġimgha u mal-mewt it-tibdiliet fil-piz għandhom jiġu kkalkulati u rrekordjati meta l-annimali jibqgħu hajjin sa ġurnata wara. L-annimali li jiġu maqtula b'mod uman minhabba t-tbatija u l-uġigh li huma *compound related* huma rrekordjati bħala mwiet *compound-related*. L-LD₅₀ għandu jiġi determinat minn metodu rikonossut.

Il-valutazzjoni tad-data għandha tinkludi l-valutazzjoni tar-relazzjonijiet, jekk ikun hemm, bejn l-espozizzjoni ta' l-annimali għas-sustanza tat-test u l-okkorrenza u l-gravità ta' l-anormalitajiet kollha, inkluzi daww ta' imġiba u daww kliniċi, feriti kbar, tibdil fil-piz tal-ġisem, il-mortalità u kwalunkwe effetti tossiċi oħra.

3. RAPPORTAĠĠ

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

▼B

- l-ispeċje, is-silta, is-sors, il-kundizzjonijiet ambjentali, dieta, eċċ.;
- kundizzjonijiet tat-test (inklużu t-tip ta' faxex: okklussivi jew mhux okklussivi);
- il-livelli tad-doża (inkluż il-mezz, jekk użat, u l-konċentrazzjonijiet);
- is-sess ta' l-animall li qed jingħata d-doża;
- it-tabulazzjoni tad-data ta' rispons tas-sess u l-livell tad-doża (i.e. in-numru ta' l-animalli li mietu jew inqatlu waqt it-test; in-numru ta' animalli li juru sinjali ta' tossiċità; in-numru ta' animalli esposti);
- il-hin tal-mewt wara d-dożaġġ, ir-raġunijiet u l-kriterji użati għall-qtil b'mod uman ta' l-animalli;
- l-osservazzjonijiet kollha;
- il-valur LD₅₀ għas-sess sugġett għal studju komplet, determinat f' 14-il jum bil-metodu ta' determinazzjoni speċifikat;
- 95 % ta' l-intervall ta' kunfidenza għall- LD50 (fejn dan huwa provdut);
- Il-kurva li turi id-doża/il-mortalità fejn hu permess bil-metodu tad-determinazzjoni
- Is-sejbiet tan-nekropsija;
- Kwalunkwe sejbiet hispatologiċi;
- Ir-riżultati ta' kwalunkwe test fuq is-sess l-iehor;
- Id-diskussjoni tar-riżultati (b'attenzjoni partikulari għall-effett li l-qtil b'mod uman ta' l-animalli jista' jkollu fuq il-valur kalkulat LD50);
- L-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (D).

4. REFERENZI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (E).

▼B

B.4. TOSSICITÀ AKUTA: IRRITAZZJONI/KORRUŻJONITAL-
ĠILDA

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għal OECD TG 404 (2002)

1.1 INTRODUZZJONI

Fil-preparazzjoni ta' dan il-metodu aġġornat, attenzjoni speċjali kienet mogħtija għat-titjib possibbli b'relazzjoni ma dak li jikkonċerna l-gid ta' l-annimali u ta' l-evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza tat-test sabiex ikunu evitati testijiet mingħajr hteġa ta' l-annimali fil-laboratorju. Dan il-metodu jinkludi r-rakkommandazzjonijiet li qabel ma jibda l-impenn deskritt għat-test *in vivo* dwar il-korrużjoni/irritazzjoni tas-sustanza, l-analiżi ta' l-evidenza peżata għandu jkun imwettaq skond id-dettalji rilevanti eżistenti. Meta d-disponabbiltà ta' dettalji mhux suffiċċjenti, dawn jistgħu ikunu żviluppati permezz ta' l-applikazzjoni ta' testijiet sekwenzali (1). L-istrateġija tat-testijiet tinkludi t-twertieq ta' testijiet validati u aċċettabbli ta' *in vitro* u kemm provvediment dwarha bhala Anness ta' dan il-metodu. B'zieda, meta xieraq, l-applikazzjoni suċċessiva, minflok simultanja, tat-tlett impjastri tat-test fuq l-annimal, fit-test inizjali *in vivo*, hija rakkommandata.

Fl-interess kemm ta' xjenza għaqlija u tal-gid ta' l-annimali, testijiet *in vivo* m'għandhomx isehhu qabel ma d-dettalji rilevanti disponibbli kollha dwar il-potenzal ta' korrossività/irritazzjoni tal-ġilda mis-sustanza jkun gew evalwati b'analiżi tal-peżar bl-evidenza. Tali dettalji għandhom jinkludu evidenza minn studju eżistenti kemm fuq il-bnedmin u/jew l-annimali tal-laboratorju, l-evidenza ta' korrossività/irritazzjoni ta' sustanza wahda struttament relatati u it-tahlitiet ta' tali sustanzi, id-dettalji li juru aċidità jew alkalinità qawwija tas-sustanza (2) (3), u r-riżultati minn testijiet validati u aċċetati kemm *in vitro* jew *ex vivo* (4) (5) (5a). Din l-analiżi għandha tnaqqas il-hteġa ta' testijiet *in vivo* dwar is-sustanzi b'korrossività/irritazzjoni tal-ġilda li dwarha evidenza suffiċċjenti tkun diġa eżistenti minn studju oħrajn rigward iz-zewġ għanijiet ahħarija.

Strateġija preferuta sekwenzali ta' testijiet, li tinkludi t-twertieq ta' testijiet validati u aċċettabbli, *in vitro* jew *ex vivo*, dwar il-korrożjoni/irritazzjoni, hija inkluzja bhala Anness għal dan il-metodu. L-istrateġija kienet żviluppata fi, u rakkommandata b'mod unanimu, mill-partecipanti ta' laqgħa ta' studju ta' l-OECD (6), u kienet giet adottata bhala l-istrateġija rakkommandata tat-testijiet fis-Sistema Armonizzata Globali għall-Klassifika ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) (7). Huwa rakkommandabbli li din l-istrateġija tat-testijiet tkun segwita qabel ma jindew xi testijiet *in vivo*. Għal sustanzi godda huwa rakkommandabbli r-resqien ta' testijiet pass b'pass għall-iżvilupp ta' informazzjoni xjentifikament soda dwar il-korrossività/irritazzjoni mis-sustanza. Għal sustanzi eżistenti b'informazzjoni mhux suffiċċjenti dwar il-korrożjoni/irritazzjoni tal-ġilda, l-istrateġija għandha tkun użata sabiex timla l-vojt fin-nuqqas tad-dettalji. L-użu ta' strateġija jew proċedura differenti tat-testijiet, jew ta' deċiżjoni li ma jkunx utilizzat it-test ta' pass b'pass, għandha tkun ġustifikata.

Jekk determinazzjoni tal-korrossività jew irritazzjoni ma tkun tista' ssir bl-użu ta' l-analiżi tal-peżar ta' l-evidenza, konsistenti mal-istrateġija sekwenzali tat-testijiet, test *in vivo* għandu jkun ikkonsidrat (ara l-Anness).

▼B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Irritazzjoni dermal (tal-ġilda): Hija l-produzzjoni ta' hsara riversibbli tal-ġilda bħala segwiment ta' l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal 4 siegħat.

Korrozzjoni dermal (tal-ġilda): Hija l-produzzjoni ta' hsara irrevirsibbli tal-ġilda nekrozi viżibbli mill-epidermis u sa ġewwa d-dermis, bħala segwiment ta' l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal sa 4 siegħat. Ir-reazzjonijiet korrossivi huma tipifikati b'ulċeri, nixxija ta' demm, qoxra bid-demm, u, fit-tmiem ta' l-osservazzjoni matul 14-il jum, b'tibdil tal-kulur minhabba l-bjudija tal-ġilda, żoni shah bi alopecia u farretti. Il-hispatologija għandha tkun ikkonsiderata sabiex tevalwa feriti dubbju.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza li għandha tkun ittestjata hija applikata f'doża singola mal-ġilda ta' annimal sperimentli; żoni tal-ġilda mhux trattati ta' l-annimal tat-test iservu għall-kontroll. Il-grad tal-korrozzjoni/irritazzjoni ikun moqri u rreġistrat matul intervalli speċifiċi u jkun aktar deskritt sabiex jipprovdi evalwazzjoni shiha ta' l-effetti. It-tul ta' żmien ta' l-istudju għandu jkun suffiċjenti sabiex tkun evalwata r-riversabbiltà jew in-nuqqas ta' riversabbiltà ta' l-effetti osservati.

L-annimali li juru sinjali kontinwi ta' dwejjaq u/jew uġiegh severi, fi kwalunkwe waqt tat-test, għandhom ikunu maqtula b'mod umanitarju, u s-sustanza tkun assessjata kif xieraq. Il-kriterja sabiex tittiehed id-deċiżjoni li jkunu maqtula b'mod umanitarju l-annimali moribondi jew li jkunu jsufri ħafna tista' tinstgħab fir-referenza (8).

1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 **Preparazzjoni tat-test *in vivo***1.4.1.1 *L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali*

Il-fenek albino huwa l-annimal preferut tal-laboratorju, u fniek żgħażaġh adulti huma użati. Ir-raġuni għall-użu ta' speċje oħrajn għandha tkun mogħtija.

1.4.1.2 *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Madwar 24 siegħa qabel it-test, is-suf għandu jkun imneħhi bi tqaxxir taż-żona dorsali minn fuq id-dhar ta' l-annimali. Kura għandha tingħata li jkunu evitati xi brix tal-ġilda, u biss l-anniamli li huma b'saħħithom, b'ġilda ntatta, għandhom ikunu użati.

Uhud mit-tip tal-fniet għandhom irqajja folti ta' suf li huma aktar prominenti f'ċerti zminijiet tas-sena. Tali żoni ta' tkabbir ta' suf folt m'għandhomx ikunu użati bħala s-siti tat-testijiet.

1.4.1.3 *Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-ghalf*

L-annimali għandhom jinzammi f'gaġġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 20 °C ($\pm$ 3 °C), għall-fniet. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-ghand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-ghalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistghu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

▼B

1.4.2 **Proċedura tat-test**1.4.2.1 *L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test*

Is-sustanza tat-test għandha tkun applikata fuq zona żgħira (madwar 6 cm²) tal-ġilda u miksija b'biċċa garża, li tinzamm fil-post bi stikk mhux irritanti. Fil-każi meta l-applikazzjoni diretta ma tkunx possibbli (eż. likwidi u ċerti dlik), is-sustanza tat-test għandha l-ewwel tkun applikata fuq biċċa garża, li imbagħad tkun applikata mal-ġilda. Il-biċċa għandha tinzamm f'kuntatt hafif mal-ġilda permezz ta' faxxa adattata semi-okklussiva, għal matul il-perjodu ta' l-espożizzjoni. Jekk is-sustanza tat-test tkun applikata fuq biċċa, din għandha tkun imwarrha mal-ġilda b'tali mod li jkun hemm kuntatt tajjeb u distribuzzjoni uniformi tas-sustanza mal-ġilda. Access mill-annimal lejn il-biċċa, jew l-ingestjoni li t-tehid manifs tas-sustanza tat-test m'għandux jithalla li jsehh.

Is-sustanzi likwidi huwa ġeneralment użati mingħajr ma jkunu mrattba. Meta jsiru t-testijiet ta' solidi (li jistghu ikunu pulverizzati, jekk hekk ikun meqjus b'hal mehtieg), is-sustanza tat-test għandha tkun niedja b'ammont żgħir ilma (jew, meta mehtieg, b'xi likwidu adattat ieħor) li jkun suffiċjenti sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Meta likwidi oħrajn apparti milli l-ilma jkunu użati, l-influenza potenzali tal-likwidu fuq l-irritazzjoni tal-ġilda mis-sustanza tat-test għand tkun ferm minima, jekk ikun hemm.

Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, li normalment ikun ta' 4 siegħat, is-sustanza residwa tat-test għandha tkun imnehhija, meta prattikabbli, bl-użu ta' ilma jew b'xi solvent xieraq mingħajr ma jibdel ir-reazzjoni eżistenti jew l-integrità ta' l-epidermis.

1.4.2.2 *Livell tad-doża*

Doża ta' 0,5 ml likwidu jew 0,5 g solidu jew dlik hija applikata maż-zona tat-test.

1.4.2.3 *It-test inizjali (It-test in vivo bl-irritazzjoni/korrożjoni dermali bl-użu ta' annimal wiehed)*

Huwa ferm rakkommandabbli li t-test *in vivo* jkun imwettaq inizjalment bl-użu ta' annimal wiehed, speċjalment meta s-sustanza tkun issuspettata li jkollha potenzal korrossiv. Dan huwa skond l-istrateġija tat-testijiet sekwenzali (ara l-Anness 1).

Meta sustanza tkun giet iġġudikata b'hal korrossiva fuq il-bazi ta' l-analizi ta' l-evidenza peżata, l-ebda aktar testijiet fuq l-annimali ma jkunu mehtieġa. Għal bosta mis-sustanzi li huma issuspettati b'hal korrossivi, aktar testijiet *in vivo* ma jkunux normalment mehtieġa. B'dana kollu, f'dawk il-każi meta informazzjoni addizzjonali tinhass li tkun mehtieġa minhabba l-evidenza mhux suffiċjenti, testijiet limitati ta' l-annimali jistghu jitwettqu bl-użu ta' dan il-metodu: Sa tlett biċċiet tat-test huma applikati b'mod sekwenzali fuq l-annimal. L-ewwel biċċa tkun imnehhija wara tlett minuti. Jekk l-ebda reazzjoni tal-ġilda ma tkun osservata, it-tieni biċċa tkun applikata u mnehhija wara siegħa. Jekk l-osservazzjonijiet f'dan l-istadju jindikaw li l-espożizzjoni tista' tithalla b'mod umanitarju, allura t-test ikun estiż għal erba' siegħat, it-tielet biċċa tkun applikata u mnehhija wara erba' siegħat, u r-reazzjoni tkun gradata.

Jekk effett korrossiv ikun osservat wara kwalunkwe mit-tlett espōżizzjonijiet sekwenzali, it-test ikun immedjetament terminat. Jekk effett korrossiv ma jkunx osservat wara li l-aħħar biċċa tkun imnehhija, l-annimal ikun osservat għal 14-il jum, sakemm il-korrożjoni ma tkunx żviluppat f'xi punt aktar kmieni.

▼B

F'dawk il-każi li fihom is-sustanza tat-test ma tkunx mistennija li tipproduċi korrozzjoni imma li tista' tkun irritanti, biċċa waħda għandha tkun applikata ma annimal wiehed għal erba' siegħat.

1.4.2.4 *Test konfermatorju (It-test in vivo ta' l-irritazzjoni tal-ġilda b'annimali addizzjonali)*

Jekk effett korrossiv ma jkunx osservat fit-test inizjali, l-irritant jew ir-reazzjoni negattiva għandhom ikunu ikkonfermati bl-użu ta' żewġ annimali oħrajn, kull wiehed b'biċċa waħda, għal perjodu ta' espożizzjoni ta' erba' siegħat. Jekk effett irritanti jkun osservat fit-test inizjali, it-test konfermatorju jista' jitwettaq b'mod sekwenzali, jew bl-espożizzjoni ta' żewġ annimali simultanjament. Fil-każ eċċezzjoni, li fih it-test inizjali ma jkunx imwettaq, tnejn jew tlett annimali jistgħu ikunu ittrattati b'biċċa waħda, li tkun imnehhija wara erba' siegħat. Meta żewġ annimali huma użati, jekk it-tnejn li huma juru l-istess reazzjoni, l-ebda testijiet oħrajn ma huma meħtieġa. Inkella, it-tielet annimal ikun ukoll ittestjat. Reazzjonijiet ekwoviċi ikunu jeħtieġu awalwazzjoni bl-użu ta' annimali addizzjonali.

1.4.2.5 *Perijodu ta' osservazzjoni*

It-tul ta' żmien ta' l-istudju għandu jkun suffiċjenti sabiex tkun evalwata r-riversabbiltà jew in-nuqqas ta' riversabbiltà ta' l-effetti osservati. B'dana kollu l-esperiment għandu jkun terminat fi kwalunkwe hin jekk dak l-annimal ikollu sinjali kontinwi ta' uġiegh jew tbaġhtija qawwija. Sabiex ikunu determinati l-effetti tar-riversabbiltà, l-annimali għandhom ikunu osservati sa 14-il jum wara t-tnehhija tal-biċċiet. Jekk l-irreversabbiltà tkun osservata qabel l-14-il jum, l-esperiment għandu jkun imwaqqaf f'dak il-waqt.

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

L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għal sinjali ta' eritema u odema, u r-reazzjoni rreġistrati wara 60 minuta, u imbagħad fi 24, 48 u 72 siegħa, wara t-tnehhija tal-biċċa. Għat-test inizjali fuq annimal wiehed, is-sit tat-test ikun ukoll eżaminat immedjetament wara li l-biċċ tkun imnehhija. Ir-reazzjoni dermali huma ggradati u rreġistrati skond il-gradi fit-tabella ta' hawn taht. Jekk ikun hemm hsara għall-ġilda li ma tistgħax tkunidentifikata bħala irritazzjoni jew korrozzjoni wara 72 siegħa, l-osservazzjonijiet jistgħu ikunu meħtieġa sal-jum 14 sabiex tkun determinata r-riversabbiltà ta' l-effetti. B'zieda ma l-osservazzjonijiet ta' l-irritazzjoni, l-effetti tossiċi kollha, bħal ma huma n-nuqqas ta' xaham min taht il-ġilda, u xi effett kuntrarji sistematiċi (eż. l-effetti fuq sinjali kliniċi ta' tossiċità u l-piż tal-ġisem), għandhom ikunu deskritti bis-shih u rreġistrati. L-eżaminazzjoni histopatoloġika għandha tkun ikkonsiderata sabiex tikklarifika r-reazzjonijiet b'mod ekwivoku.

Il-gradar tar-reazzjonijiet tal-ġilda hija neċessarjament sugġestiva. Sabiex tkun imhġegġa l-armonizzazzjoni fil-gradar tar-reazzjoni tal-ġilda u sabiex ikunu mghejjuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fiż-żamma ta' l-osservazzjonijiet u ta' l-interpretazzjoni tagħhom, il-persunal li jwettaq l-osservazzjonijiet jeħtieġu li jkunu adekwatament imharrġa fis-sistema ta' l-iggradat kif użata (ara t-Tabella ta' hawn taht). Gwida illustrata dwar l-iggradar ta' l-irritazzjoni tal-ġilda u feriti oħrajn tista' tkun ta' għajjnuna (9).

2. DATA

2.1 PREŻENTAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu miġbura f'sommarju f'għamla tabulari fir-rapport finali tat-test u għandhom ikopru l-punti kollha elenkati fis-sezzjoni 3.1.

▼B**2.2 EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

Il-marki ta' l-irritazzjoni dermal għandhom ikunu evalwati b'konnessjoni man-natura u s-severità tal-feriti, u r-riversibbilità tagħhom, jew tan-nuqqas ta' riversibbilità. Il-marki individwali ma jkunux jirra-preżentaw norma assoluta għall-propjetajiet irritanti ta' xi materjaa, minhabba li effetti oħrajn tal-materjal taat-test huma wkoll evalwati. Minflok, marki individwali għandhom ikunu meqjusa bħala valuri ta' referenza, li jehtiegu li jkunu evalwati flimkien ma l-osservazzjonijiet l-oħrajn kolha li jirriżultaaw mill-istudju.

Ir-riversibbilità tal-feriti dermal għandha wkoll tkun ikkunsidrata fl-evalwazzjoni tar-reazzjoni irritanti. Meta r-reazzjonijiet bħal ma huma l-alopeċja (żoma limitat), iperkeratozi, iperplażja u qxur, jippersistu fit-tmiem talk-perjodu ta' 14-il jum osservazzjoni, is-sustanza tat-test għandha tkun meqjusa bħala irritanti.

3. RAPPORTAĠĠ**3.1 RAPPORT TAT-TEST**

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

Raġġunar dwar it-test *in vivo*: Analizi ta' l-evidenza mal-piż ra' informazzjoni pre-eżistenti qabel it-test, inklużi r-riżultati minn strateġija ta' testijiet sekwenzali:

- deskrizzjoni tad-dettalji rilevanti disponibbli minn testijiet preċedenti;
- informazzjoni akkwistat f'kull stadju ta' l-istrateġija ta' l-ittestjar;
- deskrizzjoni tat-testijiet *in vitro* kif imwettqa, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati akkwistati bis-sustanza tat-test/referenza;
- analizi ta' l-evidenza peżata għat-tweġġ ta' l-istudju *in vivo*.

Is-sustanza tat-test:

- dettalji ta' l-identifikazzjoni (eż. numru CAS; sorsi; purità; impurità; magħrufa; n-numru tal-lot);
- in-natura fizika u l-propjetajiet fizikokimiċi (eż. pH, volatilità, solubilità, stabbilità);
- jekk tahlita, il-komposizzjoni u l-persentaġġi relattivi tal-komponenti.

Mezz:

- l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (meta xieraq), il-volum użat;
- il-gustifikazzjoni tal-mezz użat.

Annimali tat-test:

- l-ispeċji/tipi użati, ir-raġġunar għall-użu ta' l-annimali apparti milli fniek albino;
- in-numru ta' l-annimaali għal kull sess;
- il-piżijiet ta' l-annimali individwali, kemm fil-bidu u wkoll fil-konklużjoni tat-test;
- l-età fil-bidu ta' l-istudju;
- is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, eċċ.

▼B

Kundizzjonijiet tat-test:

- it-teknika taal-preparazzjoni tas-sit tal-biċċa;
- id-dettalji tal-materjali użat fil-biċċa u t-teknika tat-twahhil tal-biċċa;
- dettalji dwar il-preparazzjoni, l-applikazzjoni u t-tnehhija tas-sustanza tat-test.

Riżultati:

- tabulazzjoni tal-marki tar-reazzjoni/korrożjoni għal kull animal fil-punti kollha tal-hin tal-kejl;
- deskrizzjonijiet tal-feriti kollha, kif osservati;
- deskrizzjoni narrattiva tan-natura u l-grad ta' l-irritazzjoni jew tal-korrożjoni osservati, u xi sejbiet histopatoloġiċi;
- id-deskrizzjoni ta' xi Danni lokali oħrajn (eż. tnehhija tax-xaham minn taht il-ġilda) u l-effetti sistematiċi b'żieda ma l-irritazzjoni jew il-korrożjoni dermali.
- Diskussjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In vitro*, 2, 19-26.
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). 1. L-istudju ECVAM tal-validazzjoni internazzjonali dwar testijiet *in vitro* għall-korrossività tal-ġilda. 2. Ir-riżultati u l-evalwazzjoni mill-Grupp Amministrattiv Toxicology *in vitro* 12, pp. 483-524.
- (5a) Metodu tat-test B.40, Korrożjoni tal-Ġilda
- (6) Programm ta' Linji ta' Gwida għat-Test OECD (1996): Rapport Finali tal-Grupp ta' Studju OECD dwar l-Armonizzazzjoni tal-Validazzjoni u l-Aċċettazzjoni tal-Kriterja dwar Metodi Alternattivi għal-Testijiet Tossikoloġiċi. Li kien iżamm fi Solna, l-Isvezjam fit-22 – 24 ta' Jannar 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998), Is-Sistema tal-Klassifika Integrata Armonizzata tal-Perikoli għas-Saħha Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kumiċi, kif approvat mit-28 Laqgħa Kongunta tal-Kumitat tal-Kimika u tal-Grupp ta' Hidma dwar il-Kimika, Novembru 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

▼B

- (8) OECD (2000). Dokument ta' Gwida dwar ir-Rikonoxximent, l-Assessjar u l-Użu ta' Sinjali Kliniċi bħala għanijiet finali umanitarji għall-annimali Sperimenti Użati fl-Evalwazzjoni tas-Sigurtà. OECD, Publikazzjonijiet dwar is-Saħħa u s-Sigurtà Ambjentali. Serje dwar it-Testijiet u l-Assessjar Nru. 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
 - (9) EPA (1990). Atlas tal-Feriti Dermal, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.
- (Disponibbli ma talba minn għand is-Segretarjat ta' l-OECD).



Tabella I

IGGRADAR TAR-REAZZJONIJIET TAL-ĠILDA

Il-Formazzjoni ta' l-Eritema u l-Eskar

L-ebda eritema	0
Eritema ferm hafifa (bill-kemm tidher)	1
Eritema definita sewwa	2
Eritima moderata jew severa	3
Eritema severa (hmura ta' laham nej) għall-formazzjoni ta' l-eskar għall-prevenzjoni ta' l-eritema gradata	4

Massimu possibli: 4

Formazzjoni ta' l-odema

L-ebda oredma	0
Odema ferm hafifa (bill-kemm tidher)	1
Odema hafifa (it-trufijiet taż-żona definiti sewwa b'hanek definit)	2
Odema moderata (imqabbża b'madwar 1 mm)	3
Odema severa (imqabbża b'aktar minn 1 mm u testendi lil hinn miż-żona esposta)	4

Massimu possibli: 4

L-eżaminazzjoni histopatoloġika għandha titwettaq sabiex tikklarifika r-reazzjonijiet b'mod ekwoviku.



ANNEX

Strategija ta' testijiet Sekwenzali dwar l-Irritazzjoni u l-Korrożjoni ta' l-Għajnejn

KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI

Fl-imteressi ta' xjenza soda u l-ġid ta' l-annimali, huwa importanti li jkun evitat l-użu bla bżonn ta' l-annimali, u jkun imnaqqas it-testjar li aktar jipproduċi reazzjonijiet severi fl-annimali. L-informazzjoni kollha dwar sustanza relatata mal-potenzal tagħha ta' l-irritazzjoni/korrożjoni okulari għandha tkun evalwata bil-quddiem qabel ma jkunu ikkonsidrati t-testijiet *in vivo*. Evidenza suffiċjenti tista' tkun diġa teżisti sabiex tikklassifika sustanza tat-test dwar l-irritazzjoni ta' l-għajnejn jew tal-potenzal tal-korrożjoni mingħajr il-htieġa li jkunu mwettqa testijiet fuq l-annimali tal-laboratorju. Għalhekk, l-utilizzazzjoni ta' l-analizi peżata bl-evidenza u l-istrategija sussegwenti tat-testijiet għandha tnaqqas il-htieġa ta' testijiet *in vivo*, speċjalment jekk is-sustanza aktarx li tipproduċi reazzjonijiet severi.

Huwa rakkommandabbli li l-analizi ta' l-evidenza peżata tkun użata għall-evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti li tappartieni għas-sustanzi ta' l-irritazzjoni u l-korrożjoni ta' l-għajnejn u sabiex tiddetermina jekk studju addizzjonali, apparti mill-l-istudji *in vivo* fuq l-għajnejn, għandhom ikun u mwettqa sabiex jgħinu dwar il-karatteristiċi ta' tali potenzal. Meta aktar studji huma meħtieġa, huwa rakkommandabbli li l-istrategija ta' testijiet sekwenzali tkun utilizzata sabie tiżviluppa d-dettalji sperimentali rilevanti. Għal sustanzi li ma jkollhom l-ebda storja ta' testijiet, l-istrategija tat-testijiet sekwenzali għandha tkun utilizzata sabiex jiżviluppa l-informazzjoni meħtieġa għall-evalwazzjoni tal-korrożjoni/irritazzjoni tagħha fuq l-għajnejn. L-istrategija tat-testijiet deskritta f'dan l-Anness kienet giet żviluppata minn grupp ta' hidma tal-OECD (1). Kienet sussegwentament ikkonfermata u mkabbra fis-sistema tal-Klassifika Armonizzata Integrata dwar is-Saħħa Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kimiċi, kif ikkonfermata bit-28 Laqgħa Kongunta tal-Kumitat tal-Kimiċi u tal-Grupp ta' Hidma dwar il-Kimiċi, f'Novembru 1998 (2).

Għalkemm din l-istrategija tat-testijiet mhix parti integrali tal-metodu tat-testijiet B.5, din tesprimi r-resqien rakkommandat għad-determinazzjoni tal-propjetajiet ta' l-irritazzjoni/korrożjoni ta' l-għajnejn. Dan ir-resqien jirrappreżenta kemm l-aħjar prassi u l-mira etika dwar testijiet *in vivo* ta' l-irritazzjoni korrożjoni ta' l-għajnejn. Il-metodu tat-testijiet jipprovdi gwida għat-tweġtieq tat-test *in vivo* u sommarji u fatturi li għandhom ikunu ndirizzati qabel ma jkunu ikkonsidrati tali test. L-istrategija tat-testijiet sekwenzali tipprovdi r-resqien ta' l-evidenza peżata għall-evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti dwar il-propjetajiet ta' l-irritazzjoni/korrożjoni ta' l-għajnejn, ta' sustanza, u tar-resqien imtarraġ għall-ġenerazzjoni ta' l-informazzjoni rilevanti dwar sustanzi li dwarhom studju addizzjonali huma meħtieġa jew li dwarhom l-ebda studji ma kienu twettqu. L-istrategija tinkludi it-tweġtieq, l-ewwel ta' testijiet tal-validazzjoni u l-aċċettazzjoni *in vitro* jew *ex vivo*, u imbagħad il-metodu tat-test B.4 ta' studji dwar l-irritazzjoni/korrożjoni tal-ġilda skond iċ-ċirkostanzi speċifiċi (3) (4).

DESKRIZZJONI TA' L-ISTRATEGIJA GĦAL TESTIJET PASS B'PASS

Qabel ma jitwettqu t-testijiet bħala parti mill-istrategija tat-testijiet sekwenżjali (il-Figura), l-informazzjoni disponibbli kollha għandha tkun evalwata għad-determinazzjoni tal-htieġa tat-testijiet *in vivo* fuq l-għajnejn. Għalkemm informazzjoni sinifikanti tista' tkun akkwistata mill-evalwazzjoni ta' parametri singoli (eż. pH estremu), it-totalità ta' l-informazzjoni eżistenti għandha tkun assessjata. L-informazzjoni rilevanti kollha dwar l-effetti tas-sustanza f'dak il-każ, u ta' l-analogi strutturali tagħha, għandhom ikunu evalwati fit-teħid tad-deċiżjoni ta' l-evidenza peżata, u r-raġunar għad-deċiżjoni għandu jkun ippreżentat. L-emfasi primarja għandha tkun fuq l-informazzjoni jmana u ta' l-annimali eżistenti risward is-sustanza, segwita bl-eżitu tat-testijiet *in vitro* jew *ex vivo*. L-istudji *in vivo* ta' sustanzi korrosivi għandhom ikunu evitati, kull meta jkun possibbli. Il-fatturi meqjusa għall-istrategija tat-testijiet, jinkludu:

▼B

Evalwazzjoni ta' l-informazzjoni eżistenti, umana u ta' l-annimali (il-Pass 1). Informazzjoni eżistenti umana, eż. studji kliniċi u okkupazzjonali, u rapporti dwar il-każ, u/jew informazzjoni minn testijiet fuq l-annimali minn studji okulari għandhom ikun ikkunsidrati bħala l-ewwel haġa, minhabba li dawn jipprovdu informazzjoni relatata direttament ma l-effetti fuq l-ghajnejn. Wara dan, l-informazzjoni disponibbli mill-istudji umani u/jew ta' l-annimali, li jinvestigaw korrozzjoni/irritazzjoni dermali, għandhom ikunu evalutati. Sustanzi b'korrossività magħrufa jew ta' irritazzjoni severa, fuq l-ghajnejn, m'għandhomx ikunu imdeffsa fuq l-ghajnejn ta' l-annimali, u l-anqas m'għandhom is-sustanzi li juru effetti korrossivi jew irritanti fuq il-gilda; tali sustanzi għandhom ikunu meqjusa bħala korrossivi u/jew irritanti għall-ghajnejn, ukoll. Sustanzi b'evidenza suffiċjenti ta' non-korrossività u non-irritazzjoni, minn studji okulari preċedenti diġa mwettqa, għandhom ukoll ma jkunux ittestjati fi studji *in vivo* fuq l-ghajnejn.

Analizi tar-relazzjonijiet ta' l-attività strutturali (SAR) (il-Pass 2). Ir-riżultati tat-testijiet ta' kimika strutturalment relatata għandhom ikunu ikkunsidrati, jekk disponibbli. Meta informazzjoni, umana u/jew ta' l-annimali, suffiċjenti, tkun disponibbli dwar sustanzi jew tahlitiet strutturalment relatati ta' tali sustanzi li jindikaw il-potenzal tal-korrozzjoni/irritazzjoni ta' l-ghajnejn, dan għandu jkun present li s-sustanza tat-test tkun sejra tipproduċi l-istess reazzjonijiet. F'dawk il-każi, is-sustanza ma jkunx hemm htieġa tat-test tagħha. Informazzjoni negattiva mill-istudji tas-sustanzi strutturalment relatati jew minn tahlitiet ta' tali sustanzi ma tkunx tikkostitwixxi evidenza suffiċjenti tan-non-korrossività/non-irritabbiltà ta' sustanza permezz ta' l-istrategija tat-testijiet sekwenzali. Ir-resqien SAR validat u aċċettat għandu jkun użat sabiex jidentifika l-korrozzjoni u l-irritazzjoni potenziali kemm ta' l-effett dermali u wkoll okulari.

Propjetajiet fiżikokimiċi u r-reattivazzjoni kimika (il-Pass 3). Is-sustanzi li jesebixxu pH estremi bħal ma huma $\leq 2,0$ jew $\geq 11,5$ jistgħu ikollhom effetti lokali ferm qawwi. Jekk il-pH estrema hija l-bażi għall-identifikazzjoni ta' sustanza bħala korrossiva jew irritanti għall-ghajnejn, allura ir-riserva aċida/alkalina tagħha (il-kapaċità mewwieta) tista' wkoll tkun ikkunsidrata (5) (6). Jekk il-kapaċità mewwieta tissuggerixxi l-każ ta' sustanza ma tistgħax tkun korrossiva għall-ghajnejn, allura aktar testijiet għandhom ikunu mwettqa sabiex jikkonfermaw dan, preferibbilment bl-użu ta' test *in vitro* jew *ex vivo* validat u aċċettat (ara s-sezzjoni, il-pass 5 u 6).

Konsiderazzjoni ta' informazzjoni eżistenti oħra (il-Pass 4). L-informazzjoni disponibbli kollha dwar it-tossicità sistematika permezz tar-rotta dermali għandha tkun evalwata f'dan l-istadju. It-tossicità dermali akuta tas-sustanza tat-test għandha wkoll tkun ikkunsidrata. Jekk is-sustanza tat-test tkun uriet li hija ferm tossika bir-rotta dermali, din ma tkunx teħtieġ li tkun ittestjata fl-ghajnejn. Għalkemm mhux bilfors li neċessarjament hemm relazzjoni bejn it-tossicità akuta dermali u l-irritazzjoni/korrozzjoni ta' l-ghajnejn, dan jista' jkun preżent jekk aġent li huwa ferm tossiku via ir-rotta dermali, dan ikun ukoll jesebixxi tossicità għolja meta jkun imqiegħed fuq l-ghajnejn. Tali informazzjoni tista' wkoll tkun ikkunsidrata bejn il-Passi 2 u 3.

*Ir-riżultati mit-testijiet *in vitro* jew *ex vivo* (il-Passi 5 u 6).* Is-sustanzi li jkunu wrew propjetajiet severi korrossivi jew irritanti f'test *in vitro* jew *ex vivo* (7) (8) li jkunu ġew validati u aċċettati għall-istudju speċifikament dwar il-korrossività/irritazzjoni ta' l-ghajnejn jew tal-gilda, ma jeħtieġ li jkunu ittestjati fuq l-annimali. Jista' jkun preżent li tali sustanzi jkunu jipproduċu l-istess effetti severi *in vivo*. Jekk it-testijiet *in vitro/ex vivo* validati u aċċettati ma jkunux disponibbli, wiehed għandu jevita il-Passi 5 u 6 u jipproċiedi direttament għall-Pass 7.

*Assessjar ta' l-irritazzjoni jew tal-korrozzjoni dermali *in vivo* tas-sustanza (il-Pass 7).* Meta evidenza mhux suffiċjenti tkun teżisti li permezz tagħha tista' titwettaq analizi konklussiva ta' l-evidenza peżata tal-potenzal ta' l-irritazzjoni/korrossività ta' l-ghajnejn minn sustanza, li tkun ibbażata fuq inforazzjoni mill-istudji elenkati hawn fuq, il-potenzal ta' l-irritazzjoni/korrozzjoni *in vivo* għandha l-ewwel tkun evalwata, bl-użu tal-metodu B.4 (4) u ta' l-Anness li hemm miegħu (9). Jekk is-sustanza turi li tipproduċi korrozzjoni jew irritazzjoni severa tal-gilda, din għandha tkun ikkunsidrata bħala li hija irritant korrossiv għall-ghajnejn sakemm infomazzjoni oħra tkun tappoġġja konkluzjoni alternattiva. B'hekk, it-test *in vivo* fuq l-ghajnejn ma jkunx hemm htieġa li jitwettaq. Jekk is-sustanza ma tkunx korrossiva jew severament irritanti għall-gilda, it-test *in vivo* fuq l-ghajnejn jenhtieġ li jkun imwettaq.

▼B

Test in vivo fuq il-fniek (il-Passi 8 u 9): Testijiet okulari *in vivo* għandhom ikunu mibdija b'test inizjali li juża annimali wiehed. Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza tkun severament irritanti jew korrosiva għall-ghajnejn, aktar testiet ma jkunx meħtieġa. Jekk dak it-test ma jiżvelax xi effetti korrossivi jew severi, test konfermatorju ikun imwettaq b'żewġ annimali ohrajn.

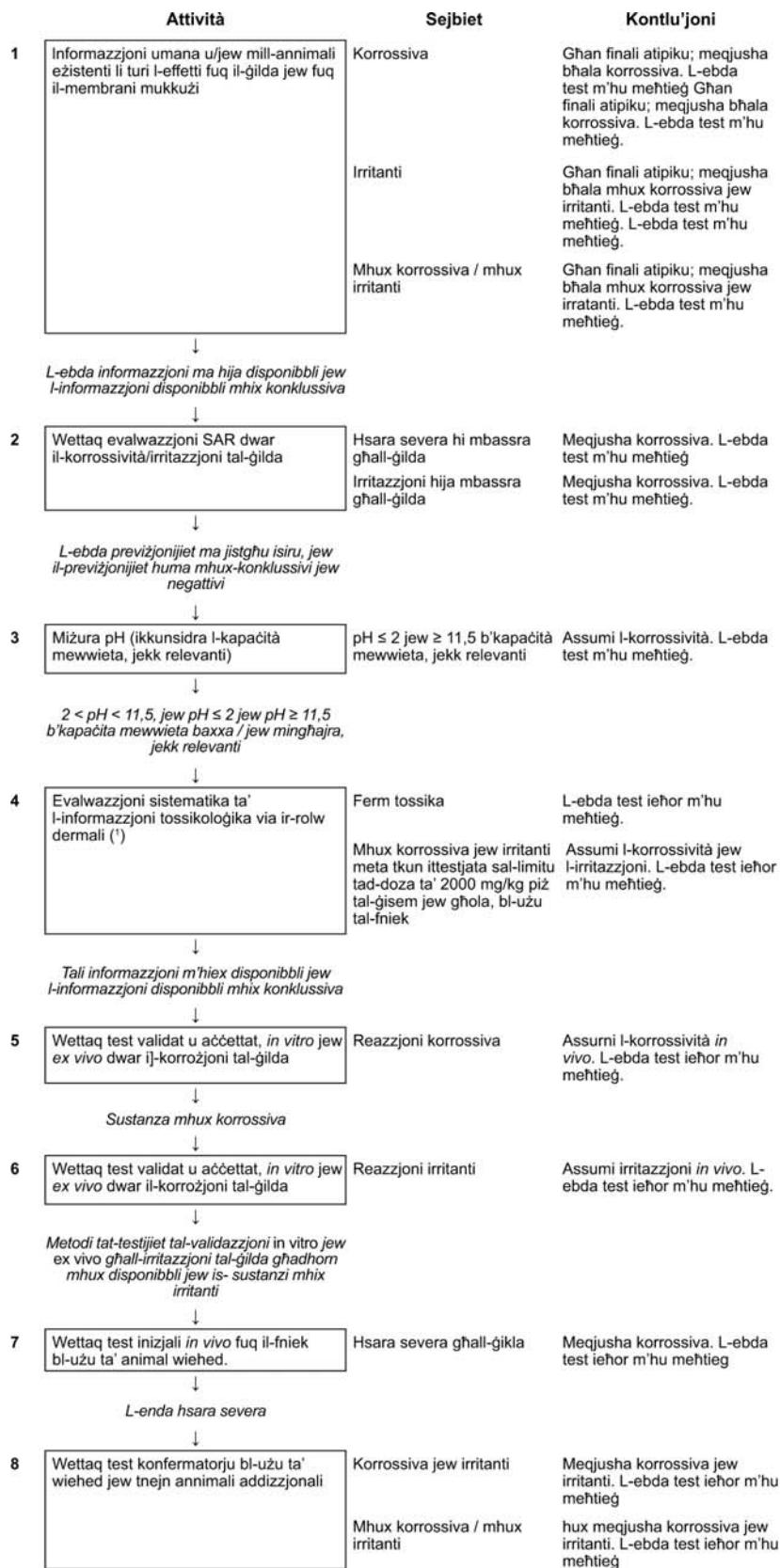
REFERENZI

- (1) Programm ta' Linji ta' Gwida għat-Test OECD (1996): Rapport Finali tal-Grupp ta' Studju OECD dwar l-Armonizzazzjoni tal-Validazzjoni u l-Aċċettazzjoni tal-Kriterja dwar Metodi Alternattivi għal-Testijiet Tossikologiċi. Li inżamm fi Solna, l-Isvezja, 22-24 ta' Jannar 1996. (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998), Is-Sistema tal-Klassifika Integrata Armonizzata tal-Perikoli għas-Sahha Umana u l-Effetti Ambjentali tas-Sustanzi Kumiċi, kif approvat mit-28 Laqgħa Kongunta tal-Kumitat tal-Kimika u tal-Grupp ta' Hidma dwarf il-Kimika, Novembru 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Metodu tat-testijiet B.4. Tossiċità akuta: Irritazzjoni/korrużjoni dermali.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In vitro*, 2, 19-26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsall, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) L-istudju ta' validazzjoni internazzjonali ECVAM dwar it-testijiet *in vitro* għall-korrossività tal-ġilda. 2. Ir-riżultati u l-evalwazzjoni mill-Grupp Amministrattiv Toxicology *in vitro* 12, pp. 483-524.



Figura

STRATEĠIJA GHAT-TESTIJET U L-EVELWAZZJONI LA' L-LRRL
LAZZJONI/KORROŻJONI DERM ALL



(¹) Tista tkun ikkunsidrata qabel il-Passi 2 u 3.

▼ M7

B.5. IRRITAZZJONI AKUTA TAL-GHAJNEJN/KORRUŻJONI

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 405 tal-OECD (2012). Il-linji gwida tat-test tal-OECD għall-Itestjar tas-Sustanzi Kimiċi jiġu riveduti kull ċertu żmien sabiex jiġi żgurat li dawn jirriflettu l-aħjar xjenza disponibbli. Fir-reviżjonijiet preċedenti ta' din il-linja gwida tat-test, inxtehtet attenzjoni speċjali fuq it-titjib permezz tal-evalwazzjoni tal-informazzjoni eżistenti kollha dwar is-sustanza kimika tat-test sabiex ikunu evitati testijiet żejda fuq l-annimali tal-laboratorju u b'hekk jiġi indirizzat it-thassib dwar it-trattament xieraq tal-annimali. TG 405 (adottata fl-1981 u aġġornata fl-1987, l-2002, u l-2012) tinkludi r-rakkomandazzjoni li qabel ma jitwettagħ it-test *in vivo* deskritt għal irritazzjoni akuta tal-ghajnejn/korrużjoni, għandha ssir analiżi tal-piż tal-evidenza (1) fuq id-dejta rilevanti eżistenti. Meta ma jkunx hemm biżżejjed dejta disponibbli, huwa rakkomandat li dawn jiġu żviluppati bl-applikazzjoni ta' testijiet sekwenzali (2) (3). L-istrategġija tat-testijiet tinkludi t-twettagħ ta' testijiet *in vitro* vvalidati u aċċettabbli u hija pprovduta bħala suppliment għal dan il-metodu ta' ttestjar. Għall-fini tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006 dwar ir-registrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH) ⁽¹⁾, strategġija ta' ttestjar integrata hija inkluda fil-Gwida tal-ECHA rilevanti wkoll (21). L-itestjar fl-annimali għandu jsir biss jekk jiġi stabbilit li dan huwa neċessarju wara li jiġu kkunsidrati l-metodi alternattivi disponibbli, u l-użu ta' dan jitqies xieraq. F'dan iż-żmien li fih qiegħed jiġi abbozzat dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat, hemm każijiet li fihom l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għadu neċessarju jew meħtieġ minn ċerti oqfsa regolatorji.

L-aħħar aġġornament iffoka l-iktar fuq l-użu ta' analġeżiċi u anestetiki mingħajr ma jithalla impatt fuq il-kunċett u l-istruttura bażiċi tal-linja gwida tat-test. ICCVAM ⁽²⁾ u bord xjentifiku internazzjonali indipendenti ta' evalwazzjoni bejn il-pari rrevedew l-utilità u l-limitazzjonijiet tal-użu spiss ta' anestetiki topiċi, analġeżiċi sistemici u punti ta' tmiem umanitarji matul l-itestjar *in vivo* tas-sikurezza tal-irritazzjoni okulari (12). Ir-reviżjoni kkonkludiet li l-użu ta' anestetiki topiċi u analġeżiċi sistemici jista' jevita hafna mill-uġiġ u t-tbatija jew kull uġiġ u tbatija bla ma jaffettwa l-eżitu tat-test, u rakkomandat li dawn is-sustanzi jintużaw dejjem. Dan il-metodu ta' ttestjar jiehu f'kunsiderazzjoni din ir-reviżjoni. Anestetiki topiċi, analġeżiċi sistemici, u punti ta' tmiem umanitarji għandhom jintużaw ta' spiss matul l-itestjar *in vivo* tal-korrużjoni u l-irritazzjoni akuta tal-ghajnejn. L-eċċezzjonijiet għall-użu tagħhom għandhom ikunu ġġustifikati. L-irfinamenti deskritti f'dan il-metodu se jridu inaqqsu b'mod sostanzjali jew jevitaw l-uġiġ u t-tbatija tal-annimali f'hafna mis-sitwazzjonijiet ta' ttestjar fejn ikun għad hemm bżonn li jsir ittestjar *in vivo* tas-sikurezza okulari.

L-immaniġġjar preventiv ibbilanċjat tal-uġiġ għandu jinkludi (i) pretrattament ta' rutina b'anestetiku topiku (eż. proparacaine jew tetracaine) u analġeżiku sistemiku (eż. buprenorphine), (ii) skeda ta' rutina ta' wara t-trattament tal-analġeżija sistemika (eż. buprenorphine u meloxicam), (iii) osservazzjoni, monitoraġġ u registrazzjoni skedati tal-annimali għal sinjali kliniċi ta' uġiġ u/jew tbatija, u (iv) osservazzjoni, monitoraġġ u registrazzjoni skedati tal-ghamla, is-severità u l-progressjoni ta' kull korrimment marbut mal-ghajnejn. Huma pprovduti iktar dettalji

⁽¹⁾ Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-registrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH), li jistabbilixxi Agenzija Ewropea għas-Sustanzi Kimiċi, li jemenda d-Direttiva 1999/45/KE u li jhassar ir-Regolament (KEE) Nru 793/93 tal-Kunsill u r-Regolament (KE) Nru 1488/94 tal-Kummissjoni kif ukoll id-Direttiva 76/769/KEE tal-Kunsill u d-Direttivi 91/155/KEE, 93/67/KEE, 93/105/KE u 2000/21/KE tal-Kummissjoni. ĠU L 304, 22.11.2007, p. 1

⁽²⁾ The US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

▼ M7

fil-proċeduri aġġornati deskritti iktar 'il quddiem. Wara l-ġhoti tas-sustanza kimika tat-test, ma għandu jiġi applikat l-ebda anestetiku jew analġeżiku topiku addizzjonali sabiex tiġi evitata interferenza mal-istudju. L-analġeżiċi b'attività antiinfjammatorja (eż. meloxicam) ma għandhomx jiġu applikati b'mod topiku, u d-dożi użati b'mod sistemiku ma għandhomx jinterferixxu ma' effetti okulari.

Id-definizzjonijiet huma stabbiliti fl-Appendiċi għall-metodu ta' ttestjar.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

Fl-interess kemm ta' xjenza għaqlija kif ukoll tat-trattament xieraq tal-annimali, testijiet *in vivo* ma għandhomx jiġu kkunsidrati qabel ma tkun giet evalwata d-dejta disponibbli kollha rilevanti għall-potenzjal ta' korrużjoni/irritazzjoni tal-ġhajnejn mis-sustanza f'analizi tal-piż tal-evidenza. Tali dejta għandha tinkludi evidenza minn studji eżistenti kemm fuq il-bnedmin u/jew l-annimali tal-laboratorju, l-evidenza ta' korrużjoni/irritazzjoni ta' sustanza jew tahlita wahda jew iktar strutturalment relatata, id-dejta li turi aċidità jew alkalinità qawwija tas-sustanza kimika (4) (5), u r-riżultati minn testijiet *in vitro* jew *ex vivo* vvalidati u aċċettati għall-korrużjoni tal-ġilda u l-korrużjoni/irritazzjoni tal-ġhajnejn (6) (13) (14) (15) (16) (17). L-istudji setghu ġew konklużi qabel l-analizi tal-piż tal-evidenza, jew bħala riżultat tagħha.

Għal ċerti sustanzi kimiċi, tali analizi tista' tindika l-htieġa għal studji *in vivo* dwar il-potenzjal tas-sustanza kimika għal korrużjoni/irritazzjoni okulari. F'dawn il-kazijiet kollha, qabel ma jiġi kkunsidrat l-użu tat-test *in vivo* tal-ġhajnejn, idealment l-ewwel għandu jsir u jiġi evalwat studju tal-effetti *in vitro* u/jew *in vivo* ta' korrużjoni tal-ġilda tas-sustanza kimika skont l-istrategġija ta' ttestjar sekwenzjali fil-metodu ta' ttestjar B.4 (7) jew l-istrategġija ta' ttestjar integrat deskritta fil-Gwida tal-ECHA (21).

Strategġija ta' ttestjar sekwenzjali, li tinkludi t-tweġġ ta' testijiet validati *in vitro* jew *ex vivo* tal-korrużjoni/irritazzjoni tal-ġhajnejn, hija inkluża bħala Supplement għal dan il-metodu ta' ttestjar u, għall-fini tar-REACH, fil-Gwida tal-ECHA (21). Huwa rakkomandat li din l-istrategġija ta' ttestjar tkun segwita qabel ma jinbdev it-testijiet *in vivo*. Għal sustanzi kimiċi ġodda, huwa rakkomandat approċċ gradwali ta' ttestjar għall-iżvilupp ta' dejta xjentifikament solida fuq il-korrużjoni/irritazzjoni tas-sustanza kimika. Għal sustanzi kimiċi eżistenti b'dejta mhux suffiċjenti dwar il-korrużjoni/irritazzjoni tal-ġilda u l-ġhajnejn, l-istrategġija tista' tintuża sabiex timla l-vojt fin-nuqqas ta' dejta. L-użu ta' strategġija jew proċedura ta' ttestjar differenti, jew id-deċiżjoni li ma jintużax approċċ gradwali ta' ttestjar, għandhom ikunu ġustifikati.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST *IN VIVO*

Wara pretrattament b'analġeżiku sistemiku u l-induzzjoni ta' anesteżija topika xierqa, is-sustanza kimika li trid tiġi ttestjata hija applikata f'doża wahda għal wahda mill-ġhajnejn tal-annimal tal-esperiment; l-ġhajn mhux trattata isservi bħala l-kontroll. Il-grad tal-irritazzjoni/korrużjoni tal-ġhajn huwa evalwat billi jiġu kklassifikati l-leżjonijiet tal-konguntiva, tal-kornea u tal-iris, f'intervalli speċifiċi. Effetti oħrajn fl-ġhajn u l-effetti sistemici avversi huma deskritti wkoll sabiex jipprovdu evalwazzjoni shiħa tal-effetti. It-tul ta' żmien tal-istudju għandu jkun biżżejjed sabiex tkun evalwata r-reversibilità jew l-irreversibilità tal-effetti.

Annimali li juru sinjali ta' tbatija u/jew uġiħ severi fi kwalunkwe stadju tat-test jew leżjonijiet konsistenti mal-punti ta' tmiem umanitarji deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar (ara l-Paragrafu 26) għandhom jinqatlu b'mod umanitarju, u s-sustanza kimika għandha tiġi vvalutata kif xieraq. Il-kriterji għat-tehid tad-deċiżjoni sabiex jinqatlu b'mod umanitarju annimali fi stat ta' agunija jew tbatija severa huma spjegati f'dokument ta' Gwida tal-OECD (8).

▼ **M7****IL-PREPARAMENTI GHAT-TEST *IN VIVO*****L-ghażla tal-ispeċijiet**

Il-fenek albino huwa l-annimal tal-laboratorju preferut, u jintużaw annimali adulti żgħażaġh b'saħħithom. Għandha tinghata raġuni għall-użu ta' razze jew speċijiet oħrajn.

Preparazzjoni tal-annimali

Iż-żewġ għajnejn ta' kull annimal sperimentali magħżul b'mod provviżorju għat-testijiet għandhom ikunu eżaminati fi żmien 24 siegħa qabel ma jibda t-test. Ma għandhomx jintużaw annimali li juru irritazzjoni fl-għajnejn, difetti okulari, jew li korrimment korneali preezistenti.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf

L-annimali għandhom jinżammu f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 20 °C ($\pm$ 3 °C) għall-fniek. Filwaqt li l-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas ta' 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għandha tiġi evitata intensità eċċessiva tad-dawl. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

PROCEDURA TAT-TEST**L-użu ta' anestetiki topiċi u analġeżiċi sistemici**

Huma rakkomandati l-proċeduri li ġejjin sabiex jiġu evitati jew minimizzati l-uġiġh u t-tbatija fil-proċeduri ta' ttestjar tas-sikurezza okulari. Minflok, jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi li ġew stabbiliti li jipprovdu evitar jew tnaqqis ekwivalenti jew aħjar tal-uġiġh u t-tbatija.

— Sittin minuta qabel l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (TCA), tinghata buprenorfina 0.01 mg/kg permezz ta' injezzjoni taħt il-gilda (SC) sabiex tipprovi livell terapewtiku ta' analġeżija sistemika. Mhuwiex magħruf jew mistenni li buprenorfina u analġeżiċi opoġdi simili oħrajn mogħtijin sistemikament jibdlu r-risponsi okulari (12).

— Hames minuti qabel it-TCA, tiġi applikata taqtira waħda jew tnejn ta' anestetiku okulari topiku (eż. 0.5 % kloridrat tal-proparacaine jew 0.5 % kloridrat tat-tetracaine) fuq kull għajn. Sabiex tiġi evitata l-interferenza possibbli mal-istudju, huwa rakkomandat anestetiku topiku li ma fihx preservattivi. L-għajn ta' kull annimal li mhijiex ittrattata b'sustanza kimika tat-test, iżda li hija ttrattata b'anestetiki topiċi, isservi ta' kontroll. Jekk jiġi anticipat li s-sustanza kimika tat-test tikkawża uġiġh u tbatija sinifikanti, normalment mhux suppost tiġi ttestjata *in vivo*. Madankollu, f'każ ta' dubju jew meta jkun hemm bżonn li jsir hekk, għandhom jiġu kkunsidrati l-applikazzjonijiet addizzjonali tal-anestetiku topiku f'intervalli ta' 5 minuti qabel it-TCA. L-utenti għandhom ikunu jafu li bosta applikazzjonijiet ta' anestetiki topiċi jistgħu potenzjalment jikkawżaw żieda hafifa fis-severità u/jew iż-żmien meħtieġ sabiex jgħibu leżjonijiet indotti kimikament.

— sigħat wara t-TCA, jinghataw buprenorfina 0.01 mg/kg SC u meloxicam 0.5 mg/kg SC sabiex jipprovdu livell terapewtiku kontinwu ta' analġeżija sistemika. Filwaqt li ma hemm l-ebda dejta li tissuggerixxi li meloxicam għandu effetti antiinfjammatorji fuq l-għajn meta jinghata SC darba kuljum, meloxicam ma għandux jinghata sa tal-inqas 8 sigħat wara t-TCA sabiex tiġi evitata kwalunkwe interferenza possibbli mal-istudju (12).

— Wara t-trattament inizjali ta' 8 sigħat wara t-TCA, buprenorfina 0.01 mg/kg SC għandha tinghata kull 12-il siegħa, flimkien ma' meloxicam 0.5 mg/kg SC

▼ **M7**

kull 24 siegħa, sakemm jitleq l-leżjonijiet okulari u ma jifdal ebda sinjal kliniku ta' uġiġh jew tbatija. Hemm disponibbli preparamenti għar-rilaxx sostnut ta' analgeziċi li jistgħu jiġu kkunsidrati sabiex inaqqsu l-frekwenza tad-dożaġġ tal-analgeziċu.

- Analgeziċja “ta' salvataġġ” għandha tingħata minnufih wara t-TCA jekk l-analgeziċja preventiva u l-anesteziċja topika ma jkunux adegwati. Jekk annimal juri sinjali ta' uġiġh u tbatija matul l-istudju, tingħata minnufih doża “ta' salvataġġ” ta' buprenorfina 0.03 mg/kg SC u din tiġi ripetuta bi frekwenza massima ta' kull 8 sigħat, jekk ikun hemm bżonn, minflok iż-0.01 mg/kg SC kull 12-il siegħa. Imbagħad meloxicam 0.5 mg/kg SC jingħata kull 24 siegħa flimkien mad-doża “ta' salvataġġ” ta' buprenorfina, iżda mhux sa tal-inqas 8 sigħat wara t-TCA.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-sustanza kimika tat-test għandha titqiegħed fil-hofra konguntivali ta' waħda mill-ghajnejn ta' kull annimal wara li l-kappell t'isfel tal-ghajn jingħibed bil-galbu lil hinn mill-boċċa tal-ghajn. Imbagħad il-kpiepel jinżammu bil-galbu magħluqin għal madwar sekonda sabiex jiġi evitat it-telf tal-materjal. L-ghajn l-oħra, li tibqa' mingħajr trattament, isservi ta' kontroll.

Irrigazzjoni

L-ghajnejn tal-annimali tat-test ma għandhomx jinhaslu għal tal-inqas 24 siegħa wara l-instillazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, hlief għas-solidi (ara l-paragrafu 18), u fil-każ ta' effetti korrużivi jew irritanti immedjati. Wara 24 siegħa, tista' ssir tlaħliha sewwa jekk jitqies li din hija xierqa.

L-użu ta' grupp satellita ta' annimali għall-investigazzjoni tal-infuwenza tal-ħasil mhuwiex rakkommandat, sakemm ma jkunx xjetifikament ġustifikat. Jekk ikun meħtieġ grupp satellita, għandhom jintużaw żewġt ifniek. Il-kundizzjonijiet tal-ħasil għandhom ikunu dokumentati bir-reqqa, eż. il-hin tal-ħasil; il-kompożizzjoni u t-temperatura tas-soluzzjoni tal-ħasil; id-durata, il-volum u l-veloċità tal-applikazzjoni.

Livell tad-doża

(1) *L-ittejtjar tal-likwidi*

Għat-testijiet tal-likwidi, tintuża doża ta' 0.1 ml. Ma għandhomx jintużaw sprejs bil-pompa għall-instillazzjoni diretta tas-sustanza kimika fl-ghajn. L-isprej tal-likwidu għandu jitneħħa u jingabar f'kontenitur qabel l-instillazzjoni ta' 0.1 ml fl-ghajn.

(2) *L-ittejtjar tas-solidi*

Meta jsiru t-testijiet ta' solidi, pejsts, u sustanzi partikolari, l-ammont użat għandu jkollu volum ta' 0.1 ml jew piż ta' mhux aktar minn 100 mg. Is-sustanza kimika tat-test għandha tkun mithuna f' trab fin. Il-volum tal-materjal solidu għandu jitkejjel wara li jkun kumpattat b'gentilezza, eż. b'taptip fuq il-kontenitur tal-kejl. Jekk is-sustanza kimika solida tat-test ma tkunx tneħħiet mill-ghajn tal-annimal tat-test b'mekkanizmi fiżjoloġiċi fl-ewwel punt tal-hin tal-osserazzjoni ta' siegħa wara t-trattament, l-ghajn tista' titlaħlah b'ilma salin jew distillat.

(3) *L-ittejtjar ta' aerosoli*

Huwa rakkommandat li l-isprejs bil-pompa u l-aerosoli kollha jingħabru qabel l-instillazzjoni fl-ghajn. L-unika eċċezzjoni hija għas-sustanzi kimiċi f'kontenituri tal-aerosoli b'pressjoni għolja, li ma jistgħux jingħabru minhabba l-vaporizzazzjoni. F'dawn il-każijiet, l-ghajn għandha tinzamm miftuħa, u s-sustanza kimika tat-test tingħata fl-ghajn f'taġġfisa sempliċi ta' madwar sekonda, minn distanza ta' 10 cm direttament quddiem l-ghajn. Din id-distanza tista' tvarja jiddependi mill-pressjoni tal-isprej u l-kontenuti tiegħu. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma ssirx ħsara lill-ghajn mill-pressjoni tal-isprej. F'każijiet xierqa, jista' jkun hemm il-htieġa li jkun evalutat il-potenzjal ta' ħsara “mekkanika” tal-ghajn mill-qawwa tal-isprej.

▼ **M7**

Tista' tinhareġ stima tad-doża minn aerosol billi t-test jiġi ssimulat kif ġej: is-sustanza kimika tiġi sprejjata fuq karta tal-użin minn fetha d-daqs ta' għajn ta' fenek imqiegħda direttament quddiem il-karta. Iz-zieda fil-piż tal-karta tintuża sabiex jiġi kkalkolat l-ammont sprejjet fl-għajn. Għal sustanzi kimiċi volatili, id-doża tista' tkun ikkalkolata bl-użin ta' kontenitur riċevitur qabel u wara t-tneħħija tas-sustanza kimika tat-test.

It-test inizjali (test *in vivo* tal-irritazzjoni/korrużjoni tal-għajn bl-użu ta' annimal wiehed)

Huwa ferm rakkomandat li t-test *in vivo* jsir inizjalment bl-użu ta' annimal wiehed (ara s-Suppliment għal dan il-metodu ta' ttestjar: Strategija ta' Ttestjar Sekwenzjali għall-Irritazzjoni u l-Korrużjoni tal-Għajnejn). L-osservazzjonijiet għandhom jippermettu li jiġu stabbiliti s-severità u r-reversibilità qabel ma jsir it-test konfermatorju f'annimal ieħor.

Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza kimika tkun korrużiva jew severament irritanti għall-għajn bl-użu tal-proċedura deskritta, ma għandhomx isiru aktar testiet dwar l-irritazzjoni okulari.

Test konfermatorju (test *in vivo* tal-irritazzjoni tal-għajn b'annimali addizzjonali)

Jekk ma jkunx osservat effett korrużiv jew irritanti severament fit-test inizjali, ir-rispons irritanti jew negattiv għandu jiġi kkonfermat bl-użu ta' massimu ta' żewġ annimali addizzjonali. Jekk jiġi osservat effett irritanti fit-test inizjali, huwa rakkomandat li t-test konfermatorju jsir b'mod sekwenzjali f'annimal wiehed wara l-ieħor, minflok ma jiġu esposti żewġ annimali addizzjonali fl-istess hin. Jekk it-tieni annimal juri effetti korrużivi jew irritanti severi, it-test m'għandux jittkompla. Jekk ir-riżultati mit-tieni annimal ikunu biżżejjed sabiex jippermettu li tiġi stabbilita klassifikazzjoni tal-periklu, ma għandu jsir ebda test ieħor.

Perjodu ta' osservazzjoni

Id-durata tal-perjodu ta' osservazzjoni għandha tkun biżżejjed sabiex ikunu evalwati l-kobor u r-reversibilità tal-effetti osservati. Madankollu, l-esperiment għandu jkun terminat fi kwalunkwe hin jekk l-annimal juri sinjali kontinwi ta' uġiġh jew tbatija severi (8). Sabiex tkun stabbilita r-reversibilità tal-effetti, l-annimali għandhom ikunu osservati normalment għal 21 jum wara l-amminis-trazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Jekk ir-reversibilità tidher qabel 21 jum, l-esperiment għandu jkun terminat f'dak il-waqt.

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

L-għajnejn għandhom jiġu evalwati b'mod komprensiv għall-preżenza jew l-assenza ta' leżjonijiet okulari siegħa wara t-TCA, segwita minn evalwazzjonijiet li tal-inqas isiru ta' kuljum. L-annimali għandhom jiġu evalwati bosta drabi kuljum għall-ewwel 3 ijiem sabiex jiġi żgurat li d-deċiżjonijiet dwar it-terminazzjoni jittieħdu fil-hin. L-annimali tat-test għandhom jiġu evalwati b'rutina għad-durata shiha tal-istudju għal sinjali kliniċi ta' uġiġh u/jew tbatija (eż. mess jew ħakk ripetut tal-għajn, teptip eċċessiv tal-għajnejn, dmugħ eċċessiv) (9) (10) (11) tal-inqas darbtejn kuljum, b'tal-inqas 6 sigħat bejn l-osservazzjonijiet, jew iktar spiss jekk ikun hemm bżonn. Dan huwa neċessarju sabiex (i) l-annimali jiġu

▼M7

vvalutati b'mod adegwat għal evidenza ta' uġigh u tbatija sabiex jittieħdu deċiżjonijiet informati fuq il-htieġa li jiżdied id-dożagġ tal-analgeziċi u (ii) l-annimali jiġu vvalutati għal evidenza ta' punti ta' tmiem umanitarji stabbiliti sabiex jittieħdu deċiżjonijiet informati dwar jekk huwiex xieraq li l-annimali jingħataw ewtanazija umanitarja, u sabiex jiġi żgurat li t-tali deċiżjonijiet jittieħdu fil-hin. It-tilwin bil-fluworoxxeina għandu jintuża ta' spiss u għandu jintuża bijomikroskopju korneali meta jitqies li dan huwa xieraq (eż. għall-valutazzjoni tal-fond tal-korrimment meta jkun hemm ulċerazzjoni korneali) bhala għajnuna fid-detezzjoni u l-kejl tal-hsara okulari, u sabiex jiġi evalwat jekk intlahqux il-kriterji tal-punt ta' tmiem stabbiliti għall-ewtanazija umanitarja. Jistgħu jingħabru ritratti diġitali tal-leżjonijiet osservati għal referenza u sabiex jiġi pprovdut rekord permanenti tal-firxa ta' hsara okulari. L-annimali għandhom jinżammu fit-test mhux aktar milli mehteġ ladarba tinkiseb l-informazzjoni definita. L-annimali li juru uġigh jew tbatija severi għandhom jinqatlu b'mod umanitarju mingħajr dewmien, u s-sustanza kimika għandha tiġi vvalutata kif xieraq.

L-annimali bil-leżjonijiet tal-ghajnejn li ġejjin wara l-instillazzjoni għandhom jinqatlu b'mod umanitarju (irreferi għat-Tabella 1 għal deskrizzjoni tal-grad tal-leżjonijiet): perforazzjoni korneali jew ulċerazzjoni korneali sinifikanti inkluża stafiloma; demm fil-kompartiment anterjuri tal-ghajn; opaċità korneali tal-grad 4; assenza ta' rifless tad-dawl (grad 2 tar-rispons iridjali) li tippersisti għal 72 siegħa; ulċerazzjoni tal-membrana konguntivali; nekrozi tal-membrana konguntivali jew nittitanti; jew tqaxxir. Dan għaliex, ġeneralment, tali leżjonijiet ma jkunux reversibbli. Barra minn hekk, huwa rakkomandat li l-leżjonijiet okulari li ġejjin jistgħu jintużaw bhala punti ta' tmiem umanitarji sabiex jiġu terminati l-istudji qabel tmiem il-perjodu ta' osservazzjoni skedat ta' 21 jum. Dawn il-leżjonijiet jitqiesu bhala prekursori ta' korrimmenti irritanti jew korrużivi u korrimmenti li mhumix mistennijin li jitolqu sa tmiem il-perjodu ta' osservazzjoni ta' 21 jum: fond sever tal-korrimment (eż. ulċerazzjoni korneali li testendi lil hinn mis-saffi superficiali tal-istroma), qerda tal-limbus > 50 % (kif evidenzjata minn tibjid tat-tessut konguntivali), u infezzjoni severa tal-ghajn (nixxija purulenti). Tahlita ta' vaskularizzazzjoni tal-wieċ tal-kornea (jiġifieri pannu korneali); żona ta' tilwin bil-fluworoxxeina li ma tonqosx maż-żmien skont valutazzjoni li ssir kuljum; u/jew nuqqas ta' riefiteljalizzazzjoni 5 ijiem wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jitqiesu wkoll bhala kriterji potenzjalment siewja li jinfluwenzaw id-deċiżjoni klinika dwar it-terminazzjoni bikrija tal-istudju. Madankollu, dawn is-sejbiet wahedhom mhumix biżżejjed sabiex jiġġustifikaw terminazzjoni bikrija tal-istudju. Ladarba jkun għew identifikati effetti okulari severi, għandu jiġi kkonsultat veterinarju tal-annimali tal-laboratorju inkarigat jew ikkwalifikat jew persunal imharreġ sabiex jidentifika l-leżjonijiet kliniċi għal eżami kliniku sabiex jistabbilixxi jekk it-tahlita ta' dawn l-effetti jiġġustifikax terminazzjoni bikrija tal-istudju. Il-grad ta' reazzjoni okulari (konguntivi, kornea u iris) għandhom jinkisbu u jiġu rreġistrati wara siegħa, 24, 48 u 72 siegħa wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (Tabella 1). L-annimali li ma jiżviluppawx leżjonijiet okulari jistgħu jiġu terminati mhux aktar qabel 3 ijiem wara l-instillazzjoni. L-annimali b'leżjonijiet okulari li mhumix severi għandhom ikunu osservati sakemm ifiqu l-leżjonijiet, jew għal 21 jum, f'liema waqt l-istudju jkun terminat. L-osservazzjonijiet għandhom isiru u jiġu rreġistrati f'tal-inqas siegħa, 24 siegħa, 48 siegħa, 72 siegħa, 7 ijiem, 14-il jum, u 21 jum sabiex jiġi stabbilit l-istatus tal-leżjonijiet, u r-reversibilità jew l-irreversibilità tagħhom. Għandhom isiru osservazzjonijiet iktar frekwenti jekk ikun hemm bżonn sabiex jiġi stabbilit jekk l-annimal tat-test għandux jiġi ewtanizzat minhabba kunsiderazzjonijiet umanitarji jew jitneħħix mill-istudju minhabba riżultati negattivi

Il-grad tal-leżjonijiet okulari (Tabella 1) għandhom jiġu rreġistrati f'kull eżami. Kwalunkwe leżjoni ohra fl-ghajn (eż. pannu korneali, tilwin, bidliet fil-kompartiment anterjuri) jew effett sistemiku avvers għandhom jiġu rrapportati wkoll.

L-eżami tar-reazzjonijiet jista' jkun iffacilitat bl-użu tal-loupe binokulari, lampa tal-ferq tal-id, bijomikroskopju, jew xi apparat xieraq iehor. Wara r-reġistrazzjoni tal-osservazzjonijiet wara 24 siegħa, l-ghajnejn jistgħu jerġghu jiġu eżaminati bl-ghajnuna tal-fluworoxxeina.

L-iggradar tar-risponsi okulari huwa neċessarjament suġġettiv. Sabiex tkun imhegġa l-armonizzazzjoni fl-iggradar tar-risponsi okulari u sabiex ikunu meġhuna l-laboratorji tat-testijiet u dawk involuti fit-tweqqif tal-osservazzjonijiet u tal-interpretazzjoni tagħhom, il-persunal li jwettaq l-osservazzjonijiet irid ikun imharreġ b'mod adegwat fis-sistema tal-puntegġ użata.

▼ **M7****DEJTA U RAPPORTAR****Evalwazzjoni tar-riżultati**

Il-klassifikazzjonijiet tal-irritazzjoni okulari għandhom jiġu evalwati b'konnessjoni man-natura u s-severità tal-lezjonijiet, u r-reversibilità jew in-nuqqas ta' reversibilità tagħhom. Il-klassifikazzjonijiet individwali ma jirrapreżentawx standard assolut għall-proprietajiet irritanti ta' sustanza kimika, minhabba li jiġu evalwati effetti oħrajn tas-sustanza kimika tat-test ukoll. Minflok, il-klassifikazzjonijiet individwali għandhom jitqiesu bħala valuri ta' referenza u jagħmlu sens biss meta jkunu sostnuti b'deskrizzjoni shiha u evalwazzjoni tal-osservazzjonijiet kollha.

Rapport tat-test

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

Il-ħsieb wara l-ittestjar in vivo: il-piż tal-evidenza ta' dejta preeżistenti tat-testijiet, inklużi r-riżultati minn strategija ta' ttestjar sekwenzali:

- deskrizzjoni tad-dejta rilevanti disponibbli minn testijiet preċedenti;
- dejta miksuba f'kull stadju tal-istrategija ta' ttestjar;
- deskrizzjoni tat-testijiet in vitro mwettqin, inklużi d-dettalji tal-proċeduri, ir-riżultati miksubin bis-sustanzi kimiċi ta' referenza/tat-test;
- deskrizzjoni tal-istudju *in vivo* dwar l-irritazzjoni/korrużjoni dermal li jkun sar, inklużi r-riżultati miksubin;
- analiżi tal-piż tal-evidenza għat-twertieq tal-istudju *in vivo*.

Sustanza kimika tat-test:

- dejta ta' identifikazzjoni (eż. isem is-sustanza u, jekk disponibbli, in-numru CAS, il-purità, l-impuritajiet magħrufin, is-sors, in-numru tal-lott);
- in-natura fiżika u l-propjetajiet fiżikokimiċi (eż. il-pH, il-volatilità, is-solubilità, l-istabilità, ir-reattività mal-ilma);
- fil-każ ta' tahlita, il-komponenti għandhom jiġu identifikati inkluża d-dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kostitwenti (eż. l-ismijiet tas-sustanzi kimiċi u, jekk disponibbli, in-numri tas-CAS) u l-konċentrazzjonijiet tagħhom;
- id-doża applikata.

Il-veikolu:

- l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni (meta xieraq), il-volum użat;
- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.

L-annimali tat-test:

- l-ispeċijiet/ir-razza użati, ir-raġuni wara l-użu ta' annimali oħrajn u mhux fniek albino;
- l-età ta' kull animal fil-bidu tal-istudju;
- in-numru ta' annimali ta' kull sess użati fit-test u fil-gruppi ta' kontroll (jekk meħtieġ);
- il-piżijiet tal-annimali individwali, kemm fil-bidu kif ukoll fil-konklużjoni tat-test;
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeg, id-dieta, eċċ.

▼ **M7***L-anestetiki u l-analgeziċi*

- id-dożi u l-hinijiet ta' meta ngħataw l-anestetiki topiċi u l-analgeziċi sistemiki;
- jekk jintuża anestetiku lokali, l-identifikazzjoni, il-purità, it-tip, id-doża, u l-interazzjoni potenzjali mas-sustanza kimika tat-test.

Ir-riżultati:

- id-deskrizzjoni tal-metodu użat sabiex jingħata punteġġ lill-irritazzjoni f'kull hin tal-osservazzjoni (eż. lampa tal-ferq tal-id, bijomikroskopju, fluworexxena);
- it-tqeghid f'tabella tad-dejta dwar ir-rispons irritanti/korrużiv għal kull annimali f'kull hin ta' osservazzjoni jew sat-tneħħija ta' kull animal mit-test;
- id-deskrizzjoni narrattiva tal-grad u n-natura tal-irritazzjoni jew tal-korrożjoni osservata;
- id-deskrizzjoni ta' kwalunkwe leżjoni oħra osservata fl-ghajn (eż. vaskularizzazzjoni, formazzjoni tal-pannu korneali, aderenzi, tilwin);
- id-deskrizzjoni tal-effetti avversi sistemiki u lokali mhux okulari, reġistrazzjoni tas-sinjali kliniċi tal-uġiħ u t-tbatija, ritratti diġitali, u sejbiet istopatoloġiċi, jekk ikun hemm.

*Diskussjoni dwar ir-riżultati***Interpretazzjoni tar-riżultati**

L-estrapolazzjoni tar-riżultati tal-istudji dwar l-irritazzjoni tal-ghajn fl-annimali tal-laboratorju għall-bnedmin hija valida biss sa ċertu punt limitat. F'hafna każijiet, il-fenek albino huwa iktar sensittiv mill-bnedmin għal irritanti jew korrużivi okulari.

Għandha tingħata attenzjoni għall-interpretazzjoni tad-dejta sabiex tkun eskluża irritazzjoni li tirriżulta minn infezzjoni sekondarja.

TAGHRIF

- (1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 — 429.
- (2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 — 164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.
- (4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.
- (5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.
- (6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, pp.483 — 524.
- (7) Kapitulu B.4 ta' dan l-Anness, Kapitulu B.4 ta' dan l-Anness.

▼ **M7**

- (8) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.
- (10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.
- (12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest-TMER.htm>
- (13) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, *Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test tar-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER)*.
- (14) Il-Kapitolu B.40bis ta' dan l-Anness, *Korrużjoni tal-Ġilda In Vitro: Test Mudell tal-Ġilda tal-Bniedem*.
- (15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.
- (16) Il-Kapitolu B.47 ta' dan l-Anness, *Metodu ta' Ttestjar tal-Opacità u l-Permeabilità tal-Kornea fil-Bovini għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Hsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jehtigux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Hsara Serja lill-Għajnejn..*
- (17) B.48 Metodu ta' Ttestjar tal-Għajnejn tat-Tigieġ Izolati għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Hsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jehtigux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Hsara Serja lill-Għajnejn.
- (18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.
- (19) UN (2011), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications.
- (20) KE (2008), ir-Regolament (KE) Nru 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-taħliti, li jemenda u jħassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. Il-ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (21) ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7-a_en.pdf

▼ **M7**

Tabella 1

L-iggradar tal-leżjonijiet okulari

Il-kornea	Grad
Opaċità: il-grad ta' densità (il-qari għandu jittiehed mill-iktar zona densa) (*)	
Ebda ulċerazzjoni jew opaċità	0
Partijiet mifruxin jew imxerrdin tal-opaċità (għajr skurar hafif ta' tleqqija normali); dettalji tal-iris vizibbli biċ-ċar	1
Parti trasluċida li tintlemaħ faċilment; dettalji tal-iris f'tit oskurata	2
Parti nakruża; ebda dettalji tal-iris vizibbli; daqs tal-ħabba f'tit li xejn jingħaraf	3
Kornea opaka; iris ma tistax tingħaraf mill-opaċità	4
Il-massimu possibbli: 4	
L-iris	
Normali	0
Tikmix fond ħafna, kongestjoni, nefhiet, iperemija ċirkumkorneali moderata; jew injezzjoni; iris reattiva għad-dawl (reazzjoni batuta titqies li hija effett	1
Emorraġija, qerda sinifikanti, jew ebda reazzjoni għad-dawl	2
Il-massimu possibbli: 2	
Il-konguntivi	
Ħmura (tirreferi għal konguntivi palpebrali u bulbari; esklużi l-kornea u l-iris)	
Normali	0
Xi vini iperemiċi (injettati)	1
Kulur diffuż, krimżi; vini individwali ma jingħarfux faċilment	2
Aħmar mitfi diffuż	3
Il-massimu possibbli: 3	
Il-kemozi	
Nefhiet (tirreferi għall-kpiepel u/jew il-membrani nittitanti)	
Normali	0
Xi nefhiet iktar min-normal	1
Nefhiet evidenti, b'everżjoni palpebrali parzjali	2
Nefhiet, bil-kpiepel kwazi nofshom magħluqin	3
Nefhiet, bil-kpiepel iktar minn nofshom magħluqin	4
Il-massimu possibbli: 4	

(*) l-parti tal-opaċità tal-kornea trid tiġi osservata

▼ **M7***Appendiċi***DEFINIZZJONIJIET**

Riserva tal-aċidi/alkali: Għal preparati aċidiċi, dan huwa l-ammont (g) ta' idrossidu tas-sodju/100 g tal-preparat mehtieg għall-produzzjoni ta' pH speċifika. Għal preparati alkalini, dan huwa l-ammont (g) ta' idrossidu tas-sodju ekwivalenti għall-aċidu sulfuriku g/100 g tal-preparat mehtieg għall-produzzjoni ta' pH speċifika (Young *et al.* 1988).

Sustanza Kimika: Sustanza jew tahlita.

Mhux irritanti: Is-sustanzi li mhumiex ikklassifikati bħala irritanti okulari tal-Kategorija I, II jew III tal-EPA; jew irritanti tal-ghajnejn tal-GHS tal-Kategorija 1, 2, 2A, jew 2B; jew il-Kategorija 1 jew 2 tal-UE (17) (18) (19).

Korrużiva okulari: (a) Sustanza kimika li tikkawża hsara irreversibbli fit-tessut għall-ghajn; (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-ghajnejn tal-GHS tal-Kategorija 1, jew irritanti okulari tal-Kategorija I tal-EPA, jew il-Kategorija 1 tal-UE (17) (18) (19).

Irritanti okulari: (a) Sustanza kimika li tipproduċi bidla reversibbli fl-ghajn; (b) Sustanzi kimiċi li huma kklassifikati bħala irritanti okulari tal-Kategorija II jew III tal-EPA; jew irritanti tal-ghajnejn tal-GHS tal-Kategorija 2, 2A jew 2B; jew il-Kategorija 2 tal-UE (17) (18) (19).

Irranti okulari severa: (a) Sustanza kimika li tikkawża hsara fit-tessut fl-ghajn li ma tfiqx fi żmien 21 mill-applikazzjoni jew tikkawża tnaqqis fiżiku sever tal-vista; (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-ghajnejn tal-GHS tal-Kategorija 1, jew irritanti okulari tal-Kategorija I tal-EPA, jew il-Kategorija 1 tal-UE (17) (18).

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

Approċċ sekwenzjali: Strategija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wiehedi jghaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun mehtieg l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Piż tal-evidenza (proċess): Il-vantaġġi u l-iżvantaġġi ta' gabra ta' informazzjoni jintużaw bħala l-bażi għal konklużjoni li jaf ma tkunx evidenti mid-dejta individwali.

▼ **M7****SUPPLIMENT GHALL-METODU TA' TTESTJAR B.5 ⁽¹⁾**

STRATEĠJA TA' TTESTJAR SEKWENZALI GHALL-IRRITAZZJONI U L-KORRUŻJONI TAL-GHAJNEJN).

Kunsiderazzjonijiet ġenerali

Fl-interessi ta' xjenza valida u t-trattament xieraq tal-annimali, huwa importanti li jkun evitat l-użu bla bżonn tal-annimali, u li jitnaqqas l-ittestjar li aktarx li jipproduċi risponsi severi fl-annimali. L-informazzjoni kollha dwar sustanza kimika relatata mal-potenzjal tagħha ta' irritazzjoni/korrużjoni okulari għandha tkun evalwata qabel ma jiġi kkunsidrat l-ittestjar *in vivo*. Jaf diġà jkun hemm biżżejjed evidenza sabiex sustanza kimika tat-test tkun tista' tiġi kklassifikata fir-rigward tal-potenzjal tagħha ta' irritazzjoni jew korrużjoni tal-ghajnejn mingħajr il-htieġa li jsiru testijiet fuq annimali tal-laboratorju. Għalhekk, l-użu ta' analiżi tal-piż tal-evidenza u strateġija ta' ttestjar sekwenzjali sejjer inaqas il-htieġa ta' testijiet *in vivo*, speċjalment jekk is-sustanza kimika aktarx li tipproduċi risponsi severi.

Huwa rakkommandat li tintuża analiżi tal-piż tal-evidenza għall-evalwazzjoni tal-informazzjoni eżistenti li tappartjeni għas-sustanzi ta' irritazzjoni u korrużjoni tal-ghajnejn u sabiex jiġi stabbilit jekk għandhomx isiru studji addizzjonali, apparti minn studji *in vivo* fuq l-ghajnejn, sabiex jgħinu fil-karatterizzazzjoni tat-tali potenzjal. Meta jkunu meħtieġa aktar studji, huwa rakkommandat li tintuża l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzali sabiex tiġi żviluppata d-dejta sperimentali rilevanti. Għal sustanzi li ma jkollhom l-ebda storja ta' ttestjar, għandha tintuża l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzali sabiex tiġi żviluppata d-dejta meħtieġa għall-evalwazzjoni tal-korrużjoni/irritazzjoni tagħhom għall-ghajnejn. L-istrateġija ta' ttestjar inizjali deskritta f'dan is-Suppliment giet żviluppata f'sessjoni ta' hidma tal-OECD (1). Imbagħad komplet tiġi kkonfermata u elaborata fis-Sistema ta' Klassifikazzjoni Integrata Armonizzata għall-Effetti fuq is-Saħħa tal-Bniedem u l-Ambjent tas-Sustanzi Kimiċi, kif approvata mit-28 Laqgħa Kongunta tal-Kumitat dwar is-Sustanzi Kimiċi u l-Grupp ta' Hidma dwar is-Sustanzi Kimiċi, f'Novembru 1998 (2), u aġġornata minn grupp ta' esperti tal-OECD fl-2011.

Għad li din l-istrateġija ta' ttestjar mhijiex parti integrata mill-metodu ta' ttestjar B.5, tesprimi l-approċċ rakkommandat għad-determinazzjoni tal-proprietajiet ta' irritazzjoni/korrużjoni tal-ghajnejn. Dan l-approċċ jirrappreżenta kemm l-aħjar Prattika kif ukoll il-parametru referenzjarju etiku għall-ittestjar *in vivo* għall-irritazzjoni/korrużjoni tal-ghajn. Il-metodu ta' ttestjar jipprovdi gwida għat-tweġib tat-test *in vivo* u jiġbor fih il-fatturi li għandhom ikunu indirizzati qabel ma jkun ikkunsidrat tali test. L-istrateġija ta' ttestjar sekwenzali tipprovdi approċċ tal-piż tal-evidenza għall-evalwazzjoni ta' dejta eżistenti dwar il-proprietajiet ta' irritazzjoni/korrużjoni tal-ghajnejn tas-sustanzi kimiċi u approċċ sekwenzjali għall-ġenerazzjoni tad-dejta rilevanti dwar sustanzi li dwarhom hemm bżonn li jsiru studji addizzjonali jew li dwarhom ma sar l-ebda studju. L-istrateġija l-ewwel tinkludi t-tweġib ta' testijiet *in vitro* jew *ex vivo* vvalidati u aċċettati u mbagħad ta' studji TM B.4 f'ċirkustanzi speċifiċi (3) (4).

Deskrizzjoni tal-istrateġija ta' ttestjar gradwali

Qabel ma jitwettqu t-testijiet bħala parti mill-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali (Figura), l-informazzjoni kollha disponibbli għandha tkun evalwata sabiex jiġi stabbilit hemmx bżonn li jsir ittestjar *in vivo* fuq l-ghajnejn. Għalkemm tista' tinkiseb informazzjoni sinifikanti mill-evalwazzjoni ta' parametri singoli (eż. pH

⁽¹⁾ Għall-użu ta' strateġija ta' ttestjar integrat għall-irritazzjoni tal-ghajnejn skont ir-REACH, ara wkoll l-ECHA Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Kapitolu R.7a: Endpoint specific guidance http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼ M7

estrema), għandha tiġi vvalutata l-informazzjoni kollha eżistenti. Id-dejta rilevanti kollha dwar l-effetti tas-sustanza kimika inkwistjoni, u tal-analogi strutturali tagħha, għandha tiġi evalwata fit-teħid tad-deċiżjoni tal-piż tal-evidenza, u għandu jiġi ppreżentat ir-raġunar wara d-deċiżjoni. L-enfasi ewlenija għandha tinxtehet fuq dejta eżistenti dwar il-bniedem u l-annimali rigward is-sustanza kimika, segwita mill-eżitu tal-ittestjar *in vitro* jew *ex vivo*. Studji *in vivo* ta' sustanzi kimiċi korrużivi għandhom ikunu evitati, kull meta dan ikun possibbli. Il-fatturi meqjusa għall-istrateġija tat-testijiet jinkludu:

Evalwazzjoni tad-dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali u/jew dejta *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati (Stadju 1).

L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata dejta eżistenti dwar il-biedem, eż. studji kliniċi u okkupazzjonali, u rapporti ta' każijiet, u/jew dejta dwar testijiet fuq l-animali minn studji okulari u/jew dejta *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati għall-irritazzjoni/korrużjoni tal-ġajnejn, għaliex din tipprovdri informazzjoni marbuta b'mod dirett mal-effetti fuq l-ġajnejn. Wara, għandha tiġi evalwata d-dejta disponibbli minn studji fuq il-bniedem u/jew l-annimali li fihom tiġi investigata l-korrużjoni/irritazzjoni dermali, u/jew studji *in vitro* minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati għall-korrużjoni tal-ġilda. Sustanzi kimiċi b'korrużjoni jew irritazzjoni severa magħrufa, fuq l-ġajnejn, m'għandhomx ikunu instillati fuq l-ġajnejn tal-annimali, u l-anqas sustanzi kimiċi li juru effetti irritanti korrużivi jew severi fuq il-ġilda; dawn is-sustanzi kimiċi għandhom jitqiesu li huma korrużivi u/jew irritanti għall-ġajnejn ukoll. Sustanzi kimiċi b'biżżejjed evidenza ta' nuqqas ta' korrużjoni u irritazzjoni minn studji okulari mwettqin fl-imghoddi ma għandhomx jiġu ttestjati fi studji *in vivo* fuq l-ġajnejn ukoll.

Analizi tar-relazzjonijiet struttura-attività (SAR) (Stadju 2).

Ir-riżultati tat-testijiet fuq sustanzi kimiċi strutturalment relatati għandhom ikunu ikkunsidrati, jekk disponibbli. Meta jkun hemm biżżejjed dejta dwar il-bniedem u/jew l-annimali fuq sustanzi relatati strutturalment jew tahlitiet tat-tali sustanzi li tindika l-potenzjal ta' korrużjoni/irritazzjoni tagħhom għall-ġajnejn, jista' jiġi supponut li s-sustanza kimika tat-test sejra tipproduċi l-istess risponsi. F'dawk il-każijiet, is-sustanza kimika jaf ma jkollhiex bżonn tiġi ttestjata. Dejta negattiva mill-istudji fuq sustanzi strutturalment relatati jew tahlitiet ta' tali sustanzi ma tkunx tikkostitwixxi evidenza suffiċjenti ta' nuqqas ta' korrużjoni/irritazzjoni ta' sustanza kimika permezz tal-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali. Għandhom jintużaw approċċi SAR vvalidati u aċċettati sabiex jiġi identifikat il-potenzjal ta' korrużjoni u irritazzjoni għal effetti dermali u dawk okulari.

Propjetajiet fizikokimiċi u r-reattività kimika (Stadju 3).

Sustanzi kimiċi li jesibixxu pH estremi bħal ≤ 2.0 jew ≥ 11.5 jista' jkollhom effetti lokali qawwija. Jekk il-pH estrema hija l-bażi għall-identifikazzjoni ta' sustanza kimika bħala korrużiva jew irritanti għall-ġajnejn, allura r-riserva aċida/alkalina tagħha (il-kapaċità mewwieta) tista' tkun ikkunsidrata wkoll (5)(6)(7). Jekk il-kapaċità mewwieta tissuggerixxi li sustanza kimika jaf ma tkunx korrużiva għall-ġajnejn (jiġifieri sustanzi kimiċi b'pH estrema u riserva aċida/alkalina baxxa), għandhom isiru iktar testijiet sabiex dan jiġi kkonfermat, idealment billi jintuża test *in vitro* jew *ex vivo* vvalidat u aċċettat (ara l-paragrafu 10).

Kunsiderazzjoni ta' informazzjoni eżistenti oħra (Stadju 4).

L-informazzjoni disponibbli kollha dwar it-tossiċità sistemika permezz tar-rotta dermali għandha tkun evalwata f'dan l-istadju. It-tossiċità dermali akuta tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun ikkunsidrata wkoll. Jekk ikun intwera li s-sustanza kimika tat-test hija ferm tossika bir-rotta dermali, jaf ma jkunx hemm

▼ **M7**

bżonn li tkun ittestjata fl-ghajnejn. Ghalkemm mhux bilfors li jkun hemm relazzjoni bejn it-tossicità akuta dermali u l-irritazzjoni/korrużjoni tal-ghajnejn, jista' jkun supponut li jekk aġent ikun ferm tossiku permezz tar-rotta dermali, dan ikun jesibixxi wkoll tossicità għolja meta jkun instillat fl-ghajnejn. Tali dejta tista' tkun ikkunsidrata wkoll bejn l-Istadji 2 u 3.

Valutazzjoni tal-korrużjoni dermali tas-sustanza kimika jekk tkun mehtiega għal finijiet regolatorji wkoll (Stadju 5).

Il-potenzjal ta' korrużjoni u irritazzjoni severa tal-ġilda għandu jiġi evalwat l-ewwel skont il-metodu ta' ttestjar B.4 (4) u s-Suppliment li jakkumpanjah (8), inkluż l-użu ta' metodi ta' ttestjar dwar il-korrużjoni tal-ġilda *in vitro* aċċettati internazzjonalment u vvalidati (9) (10) (11). Jekk jintwera li s-sustanza kimika tipproduċi korrużjoni jew irritazzjoni serja tal-ġilda, tista' tiġi kkunsidrata wkoll li hija korrużiva jew irritanti b'mod sever għall-ghajnejn. B'hekk, ma jkun mehtieg li jsir ebda test ulterjuri. Jekk is-sustanza kimika ma tkunx korrużiva jew severament irritanti għall-ġilda, għandu jsir test *in vitro* jew *ex vivo* fuq l-ghajnejn.

Ir-riżultati mit-testijiet *in vitro* jew *ex vivo* (Stadju 6).

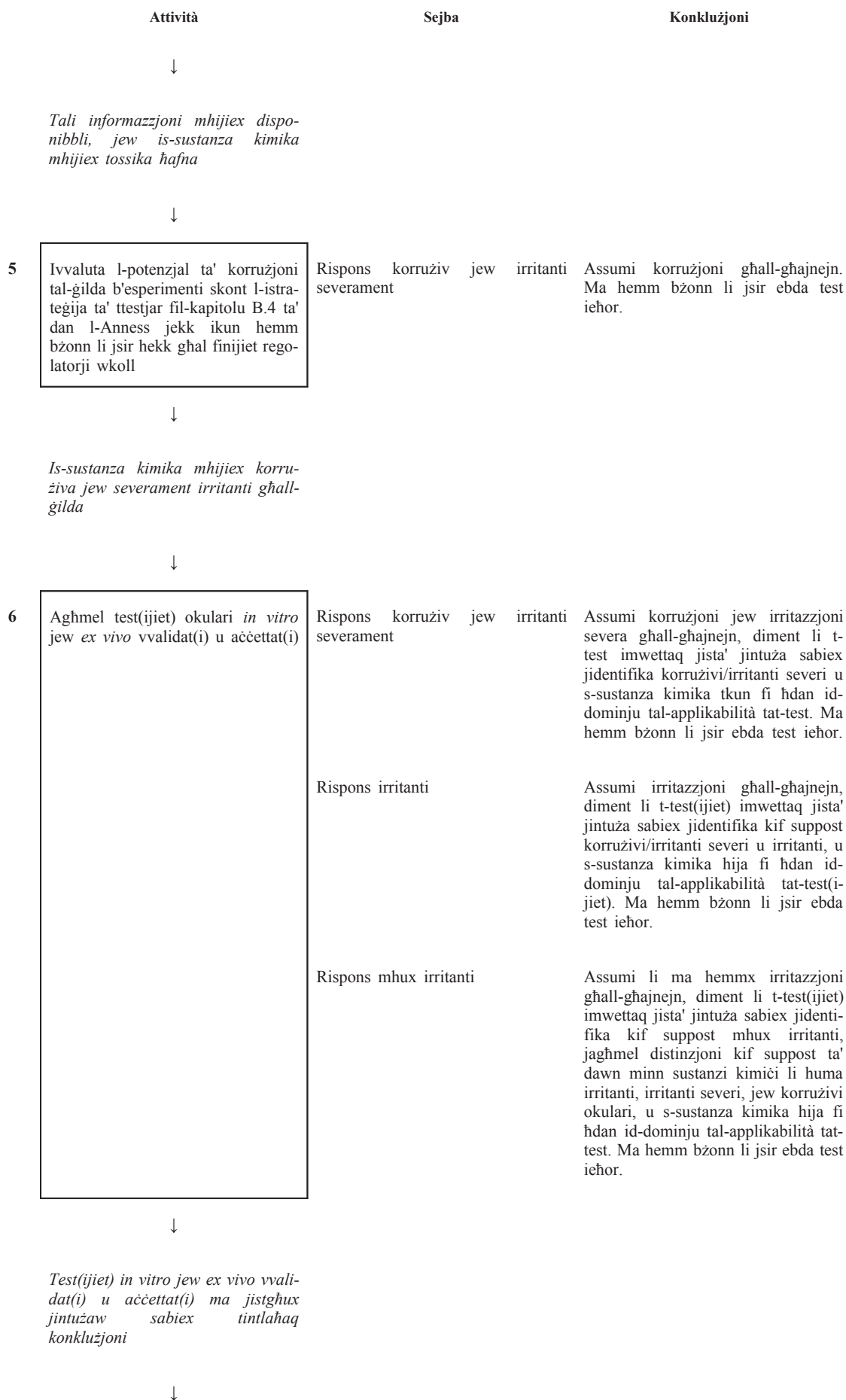
Is-sustanzi kimiċi li jkunu wrew proprjetajiet korrużivi jew irritanti severi f'test *in vitro* jew *ex vivo* (12) (13) li jkun gie vvalidat u aċċettat internazzjonalment għall-valutazzjoni speċifika tal-korrużjoni/irritazzjoni tal-ghajnejn, ma għandhomx bżonn jiġu ttestjati fl-annimali. Jista' jkun supponut li tali sustanzi kimiċi jipproduċu l-istess effetti severi *in vivo*. Jekk ma jkunx hemm testijiet *in vitro/ex vivo* vvalidati u aċċettati disponibbli, wiehed għandu jaqbeż l-Istadju 6 u jmur direttament għall-Istadju 7.

Test *in vivo* fuq il-fniek (Stadji 7 u 8):

L-ittestjar okulari *in vivo* għandu jibda b'test inizjali li juża annimal wiehed. Jekk ir-riżultati ta' dan it-test jindikaw li s-sustanza kimika tkun severament irritanti jew korrużiva għall-ghajnejn, ma għandux isir iktar ittestjar. Jekk dak it-test ma jiżvelax effetti korrużivi jew irritanti severi, isir test konfermatorju b'żewġ annimali oħrajn. Skont ir-riżultati tat-test konfermatorju, jaf ikun hemm bżonn ta' iktar testijiet. [ara l-metodu ta' ttestjar B.5]

▼ **M7****STRATEĠIJA GĦALL-ITTESTJAR U L-LEVELWAZZJONI TA' IRRITAZZJONI/KORRUŻJONI TAL-GĦAJNEJN**

	Attività	Sejba	Konklużjoni
1	Dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali, u/jew dejta <i>in vitro</i> minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati li juru l-effetti fuq l-għajnejn	Hsara severa għall-għajnejn	Punt finali apikali; ikkunsidra korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
		Irritazzjoni għall-għajnejn	Punt finali apikali; ikkunsidra irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
		Ma hemmx korrużjoni/ma hemmx irritazzjoni għall-għajnejn	Punt finali apikali; ikkunsidra li ma hemmx korrużjoni u ma hemmx irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	Dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali, u/jew dejta <i>in vitro</i> minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati li juru l-effetti korrużivi fuq il-ġilda	Korrużjoni għall-ġilda	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	Dejta eżistenti dwar il-bniedem u/jew l-annimali, u/jew dejta <i>in vitro</i> minn metodi aċċettati internazzjonalment u vvalidati li juru l-effetti irritanti severi fuq il-ġilda	Irritazzjoni severa għall-ġilda	Assumi irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test
	↓ <i>ebda informazzjoni disponibbli, jew l-informazzjoni disponibbli mhijiex konkluziva</i>		
	↓		
2	Aghmel SAR għall-korrużjoni/irritazzjoni tal-għajnejn	Hija mbassra hsara severa għall-għajnejn	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
		Hija mbassra irritazzjoni għall-għajnejn	Assumi irritazzjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	Ikkunsidra SAR għall-korrużjoni tal-ġilda	Hija mbassra korrużjoni għall-ġilda	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	↓ <i>Ma tista' ssir ebda previżjoni, jew il-previżjonijiet mhumiex konkluzivi jew huma negattivi</i>		
	↓		
3	Kejjel il-pH (kapaċità mewwieta, jekk rilevanti)	$pH \leq$ jew $\geq 11,5$ (b'kapaċità mewwieta għolja, jekk rilevanti)	Assumi korrużjoni għall-għajnejn. Ma hemm bżonn tal-ebda test.
	↓ <i>$2 < H < 11,5$, jew $pH \leq 2,0$ jew $\geq 11,5$ b'kapaċità mewwieta baxxa/ b'ebda kapaċità mewwieta, jekk rilevanti</i>		
	↓		
4	Ikkunsidra d-dejta eżistenti dwar it-tossiċità sistemika permezz tar-rotta dermali	Tossiċità għolja f'koncentrazzjonijiet li jkunu ttestjati fuq l-għajn.	Is-sustanza kimika tkun tossika wisq sabiex tiġi ttestjata. Ma hemm bżonn tal-ebda test.

▼ **M7**

▼ **M7**

	Attività	Sejba	Konklużjoni
7	Aghmel test inizjali tal-ghajnejn <i>in vivo</i> fuq il-fniek billi tuża annimal wiehed	Hsara severa għall-ghajnejn	Ikkunsidra korrużjoni lill-ghajnejn. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.
	↓		
	<i>L-ebda hsara severa, jew l-ebda rispons</i>		
	↓		
8	Aghmel test konfermatorju billi tuża annimal addizzjonali wiehed jew tnejn	Korrużjoni jew irritazzjoni Ma hemmx korrużjoni jew irritazzjoni	Ikkunsidra korrużjoni jew irritazzjoni għall-ghajnejn. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor. Ikkunsidra li ma hemmx irritazzjoni u ma hemmx korrużjoni għall-ghajnejn. Ma hemm bżonn li jsir ebda test ieħor.

TAGHRIF

- (1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Li sar f'Solna, l-Iżvezja, 22 — 24 ta' Jannar 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/C-lass/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.
- (4) Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/Korrużjoni Dermal Akuta.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsall, D.J., Holzutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in vitro* 12, pp.483 — 524.
- (7) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.
- (8) Supplement għall-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness, Strategija ta' Ttestjar Sekwenzjali għall-Irritazzjoni u l-Korrużjoni tal-Gilda.
- (9) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness, Korrużjoni tal-Gilda *In Vitro*: Test tar-Reżistenza Elettrika Transkutanja (TER).
- (10) Kapitolu B.40bis of this Annex, Korrużjoni tal-Gilda *In Vitro*: Test Mudell tal-Gilda tal-Bniedem.
- (11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼M7

- (12) Il-Kapitolu B.47 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Opacità u l-Permeabilità tal-Kornea fil-Bovini għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Hsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jehtigux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Hsara Serja lill-Għajnejn.
- (13) Kapitolu B.48 ta' dan l-Anness, Metodu ta' Ttestjar tal-Għajnejn tat-Tigieg Izolati għall-Identifikazzjoni ta' i) Sustanzi Kimiċi li Jinduċu Hsara Serja lill-Għajnejn u ii) Sustanzi Kimiċi li ma Jehtigux Klassifikazzjoni għal Irritazzjoni tal-Għajnejn jew Hsara Serja lill-Għajnejn.

▼B**B.6. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

Rimarki:

Is-sensittività u l-abbiltà tat-testijiet li jintebhu b'sensitizzaturu potenzi għall-ġilda umana huma meqjusa bħala importanti fis-sistema tal-klassifikazzjoni dwar it-tossiċità rilevanti għas-saħha pubblika.

M'hemm l-ebda metodu wiehed ta' test li b'mod adegwat jidentifika s-sustanzi kollha bil-potenzjal għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda umana u li huwa rilevanti għas-sustanzi kollha.

Fatturi bħalma huma l-karatteristiċi fiżiċi ta' sustanza, inkluża l-abbiltà tagħha li tippenetra l-ġilda, għandhom ikunu meqjusa fil-ghazla tat-test.

Żewġ tipi ta' testijiet bl-użu tal-fniek ta' l-Indi ġew żviluppati: testijiet tat-tip adġuvanti, li fihom l-istat allerġiku jkun ippotenzjat bit-taħlil jew bis-sospensjoni tas-sustanza tat-test fi Freunds Complete Adjuvant (FCA), u f'testijiet mhux adġuvanti.

Testijiet tat-tip adġuvanti pjuttost li jkunu aktar eżatti fit-tbassir ta' effett sensitizzanti probabbli tal-ġilda ta' sustanza fuq il-bniedem milli dawk il-metodi li ma jutilizzawx il-Freunds Complete Adjuvant u huma għalhekk il-metodi preferiti.

It-test tal-Massimizzazzjoni tal-Fenek ta' l-Indi (GPMT) huwa test tat-tip adġuvanti ferm użat. Ghalkemm diversi metodi oħrajn jistgħu jkunu użati għas-sejbien tal-potenzjal ta' sustanza li tikkaġuna reazzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, il-GPMT huwa meqjusa bħala li huma t-teknika adġuvinanti preferuta.

B'hafna mill-klassijiet kimiċi, testijiet mhux-adġuvinanti (dak preferut huwa t-test Buehler) huma meqjusa bħala li huma anqas sensitivi.

F'ċerti kazi jista' jkun hemm raġunijiet tajbin għall-ghazla tat-test Buehler li jinvolvi applikazzjoni topika pjuttost milli l-injezzjoni intradermali użata fit-Test tal-Massimizzazzjoni tal-Fenek ta' l-Indi. Ġustifikazzjoni xjentifika għandha tkun mogħtija meta t-test Buehler ikun użat.

It-Test tal-Massimizzazzjoni tal-fenek ta' l-Indi (GPMT) u t-test Buehler huma deskritti f'dan il-metodu. Metodi oħrajn jistgħu ikunu użati basta li dawn ikunu validati tajjeb u l-ġustifikazzjoni xjentifika tkun mogħtija.

Jekk ikun jidher riżultat pożittiv f'test ta' screening rikonoxxut, sustanza tat-test jista' jiġi ddisinjat bħala sensitizzatur potenzjali, u jista' ma jkunx meħtieġ test ieħor fuq il-fniek ta' l-Indi. Madankollu, jekk ikun hemm riżultat negattiv f'test bħal dan, it-test fuq il-fniek ta' l-Indi jrid isir bil-proċedura deskritta f'dan il-metodu tat-test.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: (kuntatt allergiku *dermatitis*) hija reazzjoni immunoloġikament *cutaneous* għas-sustanza. Fil-bniedem, irrispons jista' jkun karatterizzat minn *pruritis*, *erythema*, *oedema*, *papules*, *vesicles*, *bullae* jew kombinazzjoni ta' dawn. Fi speċje oħra ir-reazzjonijiet jistgħu ivarjaw u l-*erythema* u l-*oedema* biss jistgħu jidhru.

Espożizzjoni ta' induzzjoni: espożizzjoni sperimentali ta' suġġett għal sustanza tat-test bil-hsieb li johloq stat ipersensittiv.

Il-perjodu ta' induzzjoni: perjodu ta' mill-inqas ġimgħa wara l-espożizzjoni ta' induzzjoni li matulu jista' jżviluppa stat ipersensittiv.

Espożizzjoni ta' thaqqieq: espożizzjoni sperimentali ta' suġġett li jkun ġie trattat qabel għas-sustanza tat-test wara l-perjodu ta' induzzjoni, sabiex jiġi determinat jekk is-suġġett jirreaġixxi b'mod ipersensittiv.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sensittività u l-kredibilità tat-teknika sperimentali għandha tiġi valutata kull sitt xhur bl-użu tas-sustanzi, li huma magħrufa li jkollhom proprjetajiet ta' sensitizzazzjoni għall-ġilda ħfief għal moderati.

F'test magħmul sew, huwa mistenni li għal sesitizzaturi ħfief għal moderati jkun hemm rispons ta' mill-inqas 30 % f'test adġuvinanti u mill-inqas 15 % f'test li mhux adġuvinanti.

Is-sustanzi li ġejjin huma preferuti.

Numri CAS	Numri EINECS	Ismijiet EINECS	Ismijiet komuni
101-86-0	202-983-3	α -hexylcinnamaldehyde	α -hexylcinnamaldehyde
149-30-4	205-736-8	Benzothiazole-2-thiol (mercaptobenzothiazole)	kaptax
94-09-7	202-303-5	Benzocaine	norcaine

Jista' jkun hemm ċirkustanzi fejn, b'gustifikazzjoni adegwata mogħtija jistgħu jintużaw sustanzi ta' kontroll oħra li jissodisfaw il-kriterji t'hawn fuq.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

L-annimali għat-test huma esposti fil-bidu għas-sustanza tat-test permezz ta' injezzjonijiet intradermali u/jew applikazzjoni epidermali espożizzjoni ta' induzzjoni). Wara perjodu ta' waqfa ta' minn 10 sa 14-il jum (perjodu ta' induzzjoni), li matulu jista' jżviluppa rispons ta' immunità, l-annimali jiġu esposti għal doża ta' thaqqieq. Il-grad u l-firxa tar-reazzjoni tal-ġilda għall-espożizzjoni ta' thaqqieq fl-annimali għat-test huma mqabbla ma' dak li ntwerja fl-annimali ta' kontroll li jgarrbu l-istess trattament waqt l-induzzjoni u jirċievu l-espożizzjoni ta' thaqqieq.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODI TAT-TEST

Jekk it-tneħħija tas-sustanza tat-test hija meħtieġa, dan għandu jinkiseb bl-użu ta' l-ilma jew solvent xieraq mingħajr bidla firrispons li jkun hemm jew fl-integrità ta' l-epidermi.

▼B1.5.1. *Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek ta' l-Indi (TMFI)*

1.5.1.1. Preparazzjonijiet

Fniek ta' l-indi albino, żgħażaġh u b'saħħithom jadattaw għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju mill-inqas 5 ijiem qabel it-test. Qabel it-test, l-annimali jingħażlu bl-addoċċ fi gruppi ta' trattament. It-tnehhija tax-xagħar isir permezz ta' l-ikklippjar, tqaxxir jew possibbilment depolazzjoni kemikali, skond il-metodu tat-test użat. Għandha tingħata attenzjoni sabiex il-ġilda ma tiġix migrufa. L-annimali jintiżnu qabel jibda t-test u fi tmiemu.

1.5.1.2. Kundizzjonijiet tat-test

1.5.1.2.1. Annimali għat-test

Razzez tal-fniek ta' l-indi albino normalment użati fil-laboratorju huma utilizzati

1.5.1.2.2. In-numru u s-sess

Annimali maskili u/jew femminili jistgħu ikunu użati. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma welldu u li mhumiex tqal.

Minimu ta' 10 annimali huma użati fil-grupp ittrattat u mill-inqas 5 fil-grupp tal-kontroll. Meta inqas minn 20 test u 10 fniek ta' l-Indi jkunu ntużaw, u mhux possibbli tikkonkludi li s-sustanza għat-test hija sensitizzatur, huwa rakkomandat hafna li jiġu ttestjati iktar annimali sabiex ikun hemm mill-inqas total ta' 20 test u 10 annimali tal-kontroll.

1.5.1.2.3. Livelli tad-dożi

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija aġġustata lejn livell li jipproduċi xi ftit ta' l-evidenza ta' l-irritazzjoni tal-ġilda, imma li tkun tollerata tajjeb mill-annimali matul kull stadju ta' l-induzzjoni. Il-konċentrazzjoni użata għandha tkun il-massimu li ma jipproduċi l-ebda evidenza ta' l-irritazzjoni tal-ġilda f'annimali li mhumiex sensitizzati. Dawn il-konċentrazzjonijiet jistgħu jkunu determinati fi skala żgħira b'żewġ jew tliet annimali waqt l-istudju pilota ladarba informazzjoni oħra ma tkunx disponibbli. L-annimali trattati bl-FCA għandhom jiġu kkunsidrati għal dan il-ghan.

1.5.1.3. Il-Proċedura

1.5.1.3.1. L-induzzjoni

Jum 0 – il-grupp ittrattat

Il-pari segwenti ta' injezzjonijiet intradermali, kull waħda ta' 0,1 ml, huma mogħtija fiż-żona ta' l-ispalla li ma jkollhiex suf hekk li kull wiehed mill-pari jkun fuq kull naha taċ-ċentru ta' l-annimal.

Injezzjoni 1: it-taħlita ta' (v/v) FCA/l-ilma jew salin fiżjologiku 1:1

Injezzjoni 2: is-sustanza tat-test, bil-mezz xieraq u bil-konċentrazzjoni magħżula

Injezzjoni 3: is-sustanza tat-test bil-konċentrazzjoni magħżula fformulata f'taħlita 1:1 (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjologiku

▼B

Fl-injezzjoni 3, is-sustanzi li jinhallu fl-ilma huma mdewba fil-faži akweja qabel it-tahlit ma' l-FCA. Is-sustanzi liposolubbli jew inso-lubbli huma mdendla fl-FCA qabel il-kombinazzjoni mal-faži akweja. Il-konċentrazzjoni finali tas-sustanza għat-test għandha tkun uguali għal dik użata fit-2 injezzjoni.

L-injezzjonijiet 1 u 2 jingħataw wahda wara l-oħra u qrib ir-ras kemm jista' jkun, waqt illi l-injezzjoni 3 tkun lejn il-parti kawdjali taż-żona tat-test.

Jum 0 – il-grupp tal-kontroll

It-tliet pari ta' injezzjonijiet intradermali ta' 0,1 ml f'volum il-wahda jingħataw fl-istess żoni bħal fl-animalli trattati.

Injezzjoni 1: it-tahlita (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoloġiku 1:1

Injezzjoni 2: il-mezz mhux mahlul fl-ilma

Injezzjoni 3: formulazzjoni ta' 50 % w/v tal-mezz f'tahlita (v/v) FCA/ilma jew salin fiżjoloġiku 1:1

5-7 jum – gruppi ta' kontroll trattati

Bejn wiehed u iehor erbgħa u ghoxrin siegħa qabel l-applikazzjoni ta' l-induzzjoni topikali, jekk is-sustanza mhix irritanti għall-gilda, iż-żona tat-test, wara l-ikklippjar u/jew it-tqaxxir tiġi trattata b'0,5 ml ta' 10 % mis- sulfat lawrju tas-sodju fil-vażelina, sabiex tinholoq irritazzjoni lokali.

Jum 6-8 tal-grupp trattat

Iż-żona tat-test terġa' titnaddaf mis-suf. *Filter paper* (2 x 4 cm) titgħabba kollha bis-sustanza għat-test f'mezz xieraq u applikata fuq iż-żona tat-test u miżmuma f'kontatt permezz ta' faxxa okklus-siva għal 48 siegħa. L-ghażla tal-mezz għandha tkun ġustifikata. Is-solidi jiġu pulverizzati b'mod fin u inkorporati f'mezz xieraq. Il-likwidi jistgħu jiġu applikati mingħajr tahlit bl-ilma jekk inhu xieraq.

Jum 6-8 grupp ta' kontroll

Iż-żona tat-test terġa' titnaddaf mis-suf. Il-mezz biss huwa applikat b'mod simili liż-żona tat-test u miżmum f'kontatt permezz ta' faxxa okklus-siva għal 48 siegħa.

1.5.1.3.2. It-thaqieq

Jum 20-22 gruppi ta' kontroll trattati

Il-ġenbejn huma trattati u l-animalli tal-kontroll huma mnaddfa mix-xagħar. Biċċa jew kapsula li jkun fiha s-sustanza tat-test hija applikata ma' wiehed mill-ġnub ta' l-animalli ittrattati u l-biċċa jew il-kapsula mil-mezz biss mal-ġemb l-iehor. Il-biċċiet huma miżmuma b'faxxa okklus-siva għal 24 siegħa.

L-osservazzjoni u l-iggradar: gruppi ta' kontroll trattati

- Bejn wiehed u iehor 21 siegħa wara t-tnehhija tal-biċċa, iż-żona mħaqqa hija mnaddfa u kklippjata u/jew imqaxxa u depilata jekk ikun mehtieg,
- Bejn wiehed u iehor 3 sigħat wara (bejn wiehed u iehor 48 siegħa mill-bidu ta' l-applikazzjoni tat-thaqieq) ir-reazzjoni tal-gilda hija osservata u rrekordjata skond il-grad li jidhru fl-appendiċi;
- Bejn wiehed u iehor 24 siegħa wara din l-osservazzjoni, it-tieni osservazzjoni (72 siegħa) hija mwettqa u rrekordjata għal darb'oħra.

Il-qari bl-addoċċ ta' l-animalli ta' kontroll u tat-test huwa nkuraġġit.

Sabiex ikunu kjarifikati r-riżultati miksba fl-ewwel thaqqieqa, t-tieni thaqqieqa, fejn hu xieraq mal-grupp tal-kontroll ġdid, għandha tkun meqjusa madwar ġimgha minn wara l-ewwel wahda. Thaqqieq għat-tieni darba jista' jsir ukoll fuq il-grupp ta' kontroll oriġinali.

▼B

Ir-reazzjoni kollha tal-ġilda f'xi sejbiet mhux tas-soltu inkluzi r-reazzjonijiet sistematiċi li jirriżultaw mill-proċeduri ta' l-induzzjoni u tat-tħaqreq għandhom ikunu osservati u rrekordjati skond l-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman (Ara l-appendiċi). Proċeduri oħra, eż. L-eżaminazzjoni hispatoloġika, il-kejl tal-hxuna tat-tinja tal-ġilda, tista' titwettaq sabiex jiġu ċċarati ir-reazzjonijiet dubbjużi.

1.5.2. *It-test Buehler*

1.5.2.1. Preparazzjonijiet

Fniek ta' l-indi albino, żgħażaġh u b'saħħithom jadattaw għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju 5 ijiem qabel it-test. Qabel it-test, l-animali jingabru kif jinzeru u assenjati għall-gruppi ta' trattament. Il-pil jitneħħa billi jiġi kklippjat, imqaxxar jew possibbilment depilat kimikament skond il-metodu tat-test użat. Għandha tingħata attenzjoni sabiex tkun evitata li ssir xi ħsara lill-ġilda. L-animali jintiżnu qabel ma jibda t-test u fi tmiemu.

1.5.2.2. Il-kundizzjonijiet tat-test

1.5.2.2.1. L-animali għat-test

Razez tal-fniek ta' l-indi albino normalment użati fil-laboratorju huma utlizzati.

1.5.2.2.2. Numru u sess.

Animali maskili u/jew femminili jistgħu jintużaw. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma welldu u li mhumiex tqal.

Minimu ta' 20 animal huma użati fil-grupp ittrattat u mill-anqas 10 fil-grupp tal-kontroll.

1.5.2.2.3. Il-livelli tad-dozi

Għal kull stadju ta' l-induzzjoni, il-konċentrazzjonini tas-sustanza tat-test hija aġġustata għal-ogħla livell possibbli biex tipproduċi irritazzjoni ħafifa imma mhux eċċessiva. Il-konċentrazzjoni mhaqqa għandha tkun il-massimu tad-doża mhux irritanti. Jekk ikun meħtieġ il-konċentrazzjonini xierqa tista' tiġi determinata minn studju pilota bl-użu ta' żewġ jew tliet animali.

Għall-materjali tat-test li jinhallu fl-ilma, huwa xieraq li jintuża l-ilma jew soluzzjoni mħallta bl-ilma li ma tikkawżax irritazzjoni ta' *surfactant* bħala l-mezz. Għal materjali tat-test oħra 80 % ta' l-etanol/l-ilma huwa preferut għall-induzzjoni u t-tħaqreq ta' l-*acetone*.

1.5.2.3. Il-proċedura

1.5.2.3.1. L-induzzjoni

Jum 0 – il-grupp trattat

Ġenb wiehed huwa mnaddaf mill-pil (ikkklippjat). Is-sistema tal-biċċa għat-test għandha titgħabba tajjeb bis-sustanza għat-test f'mezz xieraq (l-ghażla tal-mezz għandha tkun ġustifikata; is-sustanzi għat-test likwidi jistgħu jiġu applikati mingħajr ma jithalltu bl-ilma, jekk ikun xieraq).

Is-sistema tal-biċċa għat-test hija applikata fuq iż-żona tat-test u mizmuma f'kuntatt permezz ta' biċċa okklussiva jew kapsula u faxxa xierqa għal 6 sigħat.

▼B

Is-sistema tal-biċċa għat-test trid tkun okklussiva. Biċċa tal-qoton hija adattata u tista' tkun tonda jew kwadra, iżda għandha tkun bejn wiehed u iehor minn 4-6 cm². Iz-żamma permezz ta' żamma xierqa hija preferuta sabiex tiżgura l-okkluzjoni. Jekk jiġi użat it-tqarwis, espożizzjonijiet addizzjonali jistgħu jkunu meħtieġa.

Jum 0 – il-grupp tal-kontroll

Ġenb wiehed huwa mnaddaf mill-pil (bl-ikklippjar). Il-mezz biss huwa applikat b'manjera simili bħal dik għall-grupp trattat. Is-sistema tal-biċċa għat-test tinzamm f'kontatt mal-ġilda b'biċċa jew kapsula okklussiva u faxxa xierqa għal 6 sığhat. Jekk jista' jintwera li grupp ta' kontroll falz mhux meħtieġ, jista' jintuża grupp ta' kontroll naïve.

Jiem 6-8 u 13-15 – il-grupp ta' kontroll trattat

Titwettagħ l-istess applikazzjoni bħal fil-jum 0 fuq l-istess żona għat-test (nadifa mill-pil jekk ikun meħtieġ) tal-ġenb fil-jum 6-8, u għal darb'ohra fil-jum 13-15.

1.5.2.3.2. It-thaqieq

Il-jum 27-29 – il-grupp ta' kontroll trattat

Il-ġenb li ma ġiex trattat ta' l-annimali ta' kontroll u trattati jtnaddaf mill-pil (bl-ikklippjar). Biċċa okklussiva jew kabina li jkun fiha l-ammont xieraq tas-sustanza għat-test tiġi applikata fil-massimu tal-konċentrazzjoni li mhix irritanti fuq il-ġenb mhux trattat ta' wara ta' l-annimali ta' kontroll u trattati.

Fejn jgħodd, biċċa okklussiva jew kabina bil-mezz biss tiġi applikata fuq il-ġenb mhux trattat ta' quddiem ta' l-annimali li huma kemm kontrollati u kemm trattati. Il-biċċiet jew kabini huma miżmuma f'kontatt permezz ta' faxex xierqa għal 6 sığhat.

1.5.2.3.3. L-osservazzjoni u l-iggradar

- Bejn wiehed u iehor 21 siegħa wara t-tnehhija tal-biċċa, ż-żona mħaqqqa hija mnaddfa mill-pil;
- Bejn wiehed u iehor tliet sığhat aktar tard (bejn wiehed u iehor 30 siegħa mill-bidu ta' l-applikazzjoni tal-biċċa tat-thaqieq) ir-reazzjoni tal-ġilda hija osservata u rrekordjata skond il-graduri murija fl-appendiċi;
- Bejn wiehed u iehor 24 siegħa wara l-osservazzjoni ta' 30 siegħa, (bejn wiehed u iehor 54 siegħa wara l-applikazzjoni tal-biċċa tat-thaqieq) ir-reazzjonijiet tal-ġilda huma għal darb'ohra osservati u rrekordjati.

Il-qari bl-addoċċ ta' l-annimali ta' kontroll u għat-test huwa nkuraġġit.

Sabiex ikunu kjarifikati r-riżultati miksuba fl-ewwel thaqqieqa, t-tieni thaqqieqa, fejn hu xieraq mal-grupp tal-kontroll ġdid, għandha tkun meqjusa madwar ġimgha minn wara l-ewwel wahda. Thaqqieq għat-tieni darba jista' jsir ukoll fuq il-grupp ta' kontroll oriġinali.

▼B

Ir-reazzjoni kollha tal-ġilda f'xi sejbiet mhux tas-soltu inklużi r-reazzjonijiet sistematiċi li jirriżultaw mill-proċeduri ta' l-induzzjoni u tat-thaqgieq għandhom ikunu osservati u rrekordjati skond l-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman (Ara l-appendiċi). Proċeduri oħra, eż. L-eżaminazzjoni hispatoloġika, il-kejl tal-hxuna tat-tinja tal-ġilda, tista' titwettagħ sabiex jiġu ċċarati ir-reazzjonijiet dubbjużi

2. **DATA (GPMT u t-test buehler)**

Id-data għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull annimal individwali r-reazzjonijiet tal-ġilda għal kull perjodu ta' l-osservazzjoni.

3. **RAPPURTAĠĠ (GPMT u t-test Buehler)**

Jekk l-*iscreening* isir qabel it-test fuq il-fenek ta' l-Indi, id-deskrizzjoni jew ir-referenza tat-test (eż. It-Test ta' l-Infiħ tal-Widnejn tal-Gurdien (TIWG), inklużi d-dettalji tal-proċedura, iridu jingħataw flimkien mar-riżultati miksuba mas-sustanzi tat-test u tar-referenza.

Rapport tat-test (GPMT u t-test Buehler)

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

Animali għat-test:

- ir-razza tal-fniek ta' l-indi użata;
- in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;
- is-sors. Il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew. Id-dieta eċċ.;
- il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test u fi tmiemu.

Il-kundizzjonijiet tat-test

- it-teknika tal-preparazzjoni taż-żona tal-biċċa;
- id-dettalji tal-materjali tal-biċċa użati u t-teknika tal-biċċa;
- ir-riżultat ta' l-istudju pilota bil-konkluzjoni fuq l-induzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-thaqgieq li jridu jintużaw fit-test;
- id-dettalji tal-preparazzjoni tas-sustanza għat-test, l-applikazzjoni u t-tnehhija;
- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;
- il-mezz u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza għat-test użati għall-induzzjoni u l-espożizzjonijiet tat-thaqgieq u l-ammont totali tas-sustanza applikata għall-induzzjoni u għat-thaqgieq.

Ir-riżultati:

- taqsira tar-riżultati ta' l-aħħar ċekkjatura għas-sensittività u għall-kredibilità (ara 1.3) inkluża l-informazzjoni fuq is-sustanza, il-konċentrazzjoni u l-mezz użat;

▼B

- ta' kull animal inkluża s-sistema ta' gradazzjoni;
- deskrizzjoni narrativa ta' l-effetti tan-natura u tal-gradji osservati;
- kwalunkwe sejbiet hispatologiċi.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

4.

REFERENZI

Dan il-metodu huwa analogu għal OECD TG 406

▼B*Appendiċi**TABELLA*

**L-iskala ta' gradazzjoni ta' Magnusson/Kligman għall-evalwazzjoni tat-test
għar-reazzjonijiet tal-biċċa tat-thaqiq**

0 = l-ebda bidla ċara

1 = *erythema* moderata jew fi dbabar

2 = *erythema* moderata u konfluwenti

3 = *erythema* intensa u nefha

▼M4

B.7. STUDJU DWAR IT-TOSSICITÀ ORALI TA' DOŻA RIPETUTA KULL 28 JUM FIR-RODITURI**DAHLA**

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-newrotossicità u l-immunotossicità.
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 godda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (8). Element wiehed tal-attività kien li tkun aġġornata l-linja gwida eżistenti tal-OECD għal "studju dwar it-tossicità orali ta' doża ripetuta kull 28 jum fir-roditori" (TG 407) b'parametri adatti biex tkun individwata attività endokrinali ta' kimiċi għall-ittestjar. Din il-proċedura għaddiet minn programm internazzjonali estensiv biex tittestjata għar-rilevanza u l-prattikabbiltà tal-parametri addizzjonali, il-prestazzjoni ta' dawn il-parametri għal kimiċi b'attività (anti)estrogenika, (anti)androġenika u (anti)tirojde, l-intra- u l-inter-riproduċibbiltà tal-laboratorju u l-interferenza tal-parametri l-godda ma' daww 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-programm tat-test internazzjonali. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jippermetti li ċerti effetti medjati mis-sistema endokrinali jitqieghdu f'kuntest ma' effetti tossikoloġiċi oħra.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Fil-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kimika, id-determinazzjoni ta' tossicità orali bl-użu ta' doži ripetuti tista' ssir wara li tkun inkisbet l-informazzjoni inizjali dwar it-tossicità bl-ittestjar ta' tossicità akuta. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa maħsub biex ikunu investigati l-effetti fuq varjetà wiesgħa hafna ta' miri potenzjali ta' tossicità. Jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalghu 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 jgħolqu interferenza fil-fizjoloġija tat-tirojde. Jista' jipprovdi wkoll dejta dwar kimiċi li jaffettwaw l-organi riproduttivi tar-raġel u/jew tal-mara f'annimali adulti żgħażaġh 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 jinkludi l-istudju dwar id-doża baziċa ripetuta ta' tossicità li jista' jintuża għal kimiċi li dvarhom ma jkunx jista' jsir studju ta' 90 jum (eż. meta l-volum tal-produzzjoni ma jkunx jeċċedi ċerti limiti) jew bħala preliminari għal studju fit-tul. Id-durata tal-espożizzjoni għandha tkun ta' 28 jum.

▼ M4

5. Il-programm internazzjonali imwettaq skont il-validazzjoni ta' parametri adatti biex potenzjalment tinstab attività endokrinali ta' kimika għall-ittestjar wera li l-kwalità tad-dejta miksuba b'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 tkun tiddependi hafna 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. Giet żviluppata gwida dwar l-istopatoloġija (19). Hija disponibbli fuq is-sit tal-Internet pubbliku tal-OECD dwar il-Linji Gwida tat-Testijiet. Hija mahsuba biex tassisti lill-patoloġisti fl-eżamijiet tagħhom u tghin biex tizzied 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 jghinu fid-detezzjoni tal-interferenti endokrinali huma proposti bħala punti tat-tmiem fakultattivi (ara Appendiċi 2).
6. Abbazi ta' dejta ġġenerata fil-proċess ta' validazzjoni, għandu jkun enfazzzjat 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-hajja li jkun l-aktar sensittiv għal taqlib endokrinali. Il-Metodu ta' Ttestjar, madankollu, matul il-proċess ta' validazzjoni identifika sustanzi li kienu jaffettwaw b'mod dgħajjef u b'saħħtu l-funzjoni tat-tirojde, u sustanzi endokrinali attivi f'saħħithom u moderati li kienu qed jaġixxu permezz ta' reċetturi ta' estroġenu jew androġenu, iżda kważi fil-kazijiet kollha naqas milli jidentifika sustanzi endokrinali attivi li b'mod dgħajjef jaffettwaw reċetturi ta' estroġenu jew androġenu. Għalhekk ma jistax ikun deskritt bħala analiżi ta' tgharbil 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 wahdu 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-tehid 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 taht 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'dozi gradwati lil diversi gruppi ta' annimali għall-esperimenti, b'livell ta' doza wahda 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-ewtnasja matul it-test issirihom awtopsja u fit-tmiem tat-test l-annimali li jkunu baqgħu hajjin jinqatlu bl-ewtnasja u ssirihom awtopsja. Studju ta' 28 jum jipprovdri informazzjoni dwar l-effetti ta' espożizzjoni orali ripetuta u jista' jindika l-htiega ta' aktar

▼ **M4**

studji ta' aktar tul ta' żmien. Jista' jipprovdi wkoll informazzjoni dwar l-ghażla 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 Hażin 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 tinghata ġustifikazzjoni dettaljata jekk il-parametri speċifikati f'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7 ikunu investigati fi speċijiet oħra ta' rodituri. Għalkemm huwa bijologikament plawżibbli li speċijiet oħra għandhom jirrispondu għal sustanzi tossiċi bl-istess mod bħall-far, l-użu ta' speċijiet iżgħar jista' jirriżulta f'aktar varjabbiltà minhabba 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 żgħażaġh f'saħħithom ta' razzi li komunement jintużaw fil-laboratorju. In-nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx jkunu tqal. Għandu jinbeda dożaġġ malli jkun fattibbli wara l-flim, u, f'kull każ, qabel ma l-annimali ikollhom disa' ġimghat. Malli jinbeda l-istudju l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati għandha tkun minima u m'għandhiex taqbeż $\pm 20\%$ tal-piż medju taż-żewġ sessi. Meta tinghata 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-annimali tal-laboratorju. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). 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' $50\text{--}60\%$. 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-ghażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-htieġa li tkun żgurata tahlita 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'gagēġ, m'għandux ikun hemm aktar minn hames annimali jabitaw f'gagēga 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 żgħażaġh f'saħħithom ikunu assenjati b'mod każwali lill-gruppi ta' kontroll u trattament. Il-gagēġ għandhom ikunu rrangati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minhabba t-tqegħid tal-gagēġ. L-annimali għandhom ikunu identifikati individwalment u jinżammu fil-gagēġ tagħhom għal mill-anqas hamest ijiem qabel ma jibda l-istudju tad-trattament biex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Preparazzjoni ta' doži

15. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata b'gavage (bil-forza) jew mad-dieta jew mal-ilma tax-xorb. Il-metodu ta' amministrazzjoni orali jkun jiddependi mill-ghan tal-istudju, u mill-proprjetajiet fiżiċi/kimiċi/tossikokinetiċi tal-kimika għall-ittestjar.

▼ **M4**

16. Meta jkun mehtieg, il-kimika għall-ittestjar tinhall jew tiġi sospiza f'vejji-kolu 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-qamha) 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.

PROCEDURA**Għadd u sess tal-annimali**

17. Mill-anqas 10 annimali (hames nisa u hames irġiel) għandhom ikunu użati fil-livell ta' kull doża. Jekk tkun ippjanata ewtanazja interim, l-għadd għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimalii li jinqatlu bl-ewtanazja qabel jittesta l-istudju. Għandha tingħata konsiderazzjoni għal grupp satellitarju addizzjonali ta' għaxar annimali (hamsa 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. Generalment, għandhom jintużaw mill-anqas tliet gruppi ta' test u grupp ta' kontroll, iżda jekk minn valutazzjoni ta' dejta oħra, ma jkunu mistennija l-ebda effetti f'doża ta' 1 000 mg/kg bw/d, ikun jista' jsir test ta' limitu. Jekk ma jkun hemm l-ebda dejta adattata disponibbli, jista' jsir studju dwar tiftix ta' firxa (annimali tal-istess razza u sors) bħala għajnuna għad-determinazzjoni tad-doži li jkollhom jintużaw. Hlief 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 jintgħazlu 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 jintgħazel bil-ghan li jġib effetti tossiċi iżda mhux il-mewt jew tbatija severa. Minn hemm 'il quddiem, għandha tintgħazel sekwenza dejjem tonqos tal-livelli tad-doża biex jintwera kull rispons relatat ma' dożaġġ u l-ebda effetti ħżiena osservati fl-aktar livell baxx tad-doża (NOAEL). Intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss ikunu l-aħjar biex ikunu stabbiliti l-livelli neżlin tad-doži, u z-zieda 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 jistghu ma jkunux risponsi tossiċi (eż. konsum anqas ta' ikel, tkabbir tal-fwied), l-effetti osservati fuq punti ta' tmiem sensittivi immunitarji, newroloġiċi jew endokrinali għandhom 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 (abbazi 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 shih bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jitqisx li jkun mehtieg. It-test ta' limitu japplika hlief meta espożizzjoni umana tindika l-htieġa li jkollu jintuża livell oghla ta' doża.

▼ M4

Amministrazzjoni ta' dozi

22. L-annimali jinghataw doża b'kimika għall-ittestjar kuljum 7 ijiem fil-ġimgha 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 rqiġ ta' intubazzjoni adattat. Il-volum massimu tal-likwidu li jkun jista' jiġi amministrat f'waqt wiehed ikun jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem hliel fil-każ ta' soluzzjonijiet fl-ilma fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. Hliel għal kimiċi irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti ta' irritazzjoni b'konċentrazzjonijiet oġhla, 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 wiehed 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'hinijiet simili għal kull jum, u aġġustata kif mehtieg biex jinżamm livell wiehed 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 fiz-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 generali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess hin(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 jithallew isiru paraguni skont is-sugġetti), u mill-anqas darba fil-ġimgha 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 hin tal-jum f'kull okkażjoni. Għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta' punti, iddefiniti esplicitament 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. dmugh, 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 bizarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (2).
27. Fir-raba' ġimgha ta' espożizzjoni għandhom isiru valutazzjoni tar-reattività sensorja għal stimuli ta' tipi differenti (2) (eż. stimuli tas-smiġh, viżivi u proprjoċettivi) (3)(4)(5), valutazzjoni tal-qawwa tal-qabda (6) u tal-attività motorja (7). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkun segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda, jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

▼ M4

28. Osservazzjonijiet funzjonali magħmulin fir-raba' ġimgha ta' espożizzjoni jistgħu jithallew 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-naha l-oħra, id-disponibbiltà ta' dejta dwar osservazzjonijiet funzjonali mill-istudju ta' doża ripetuta tista' ssahħah il-kapaċità biex jintgħażlu doži għal studju subkroniku sussegwenti.
29. Bħala eċċezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu wkoll jithallew barra għal gruppi li xort'oħra juru sinjali ta' tossiċità tant li tfixxkel b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.
30. F'awtopsja, iċ-ċiklu estruż tan-nisa kollha jista' jiġi ddeterminat (b'mod fakultattiv) billi jittiehdu 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-estrogenu [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-ġimgha. Il-kejljiet tal-konsum tal-ikel għandu jsir mill-anqas kull ġimgha. Jekk il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu wkoll jitkejjel mill-anqas kull ġimgha.

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' hin/potenzjal għal embolizmu. 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-demem għandhom jittiehdu minn sit imsemmi eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtnasja tal-annimali, u għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. L-annimali għandhom jinżammu msajmin tul il-lejl qabel l-ewtnasja ⁽¹⁾.

Bijokimika klinika

34. Id-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika għall-investigazzjoni tal-effetti tossiċi maġġuri f'tessuti u, speċifikament, ta' effetti fuq il-kliwi u l-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demem miksubin mill-annimali kollha eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-ewtnasja tal-annimali (minbarra dawk misjubi moribondi u/jew li jinqatlu bl-ewtnasja 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 aminotransferazi, aspartate aminotransferazi, fosfatazi alkalina, γ -glutamyl trans-peptidase u glutamat ta' deidroġenazi), 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 ġimgha tal-istudju bl-użu ta' ġbir ta' volum ta' awrina li jkun ittehdilha l-hin; dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina, glukożju u demm/celluli tad-demem.

⁽¹⁾ Għal għadd ta' kejljiet 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 inevitabbilmint tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, għandha tendenza li tahbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċli. Min-naha l-oħra, iżda, is-sawm tul il-lejl jista' johlq interferenza fil-metabolizmu 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) ġimgha tal-istudju.

▼ M4

36. Flimkien ma' dan, għandhom jitqiesu studji biex ikunu investigati markaturi ta' plazma jew serum ta' hsara ġenerali għal tessuti. Determinazzjonijiet oħra li għandhom isiru, jekk il-proprietajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar ikunu jistgħu jew ikunu ssuspettati li jaffettwaw profili metabolici relatati, jinkludu kalċju, fosfat, trigliceridi, ormoni speċifiċi u kolinesterazi. Dawn jehtigilhom ikunu identifikati għal kimiċi f'ċerti klassijiet jew abbazi ta' każ każ.

37. Għalkemm fl-evalwazzjoni internazzjonali tal-punti ta' tmien 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' plazma 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 ffrizati f' - 20° għall-ħzin. Il-fatturi li ġejjin jistgħu jinfluwenzaw il-varjabbiltà u l-konċentrazzjonijiet assoluti tad-determinazzjonijiet tal-ormoni:

— il-hin tal-qatla minhabba 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'analizi istopatoloġika milli bil-livelli tal-ormoni.

38. Kampjuni ta' plazma maħsubin speċifikament għal determinazzjoni tal-ormoni għandhom jinkisbu f'hin komparabbli tal-jum. Huwa rrakkomandat li tinghata konsiderazzjoni lid-determinazzjonijiet ta' T3, T4 u TSH mibdija bbazati fuq alterazzjonijiet ta' istopatoloġija tat-tirojde. Il-valuri numerici miksubin meta jkunu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni jkunu differenti fost diversi settijiet ta' analizi 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 taht 25 għal T3 u T4 u taht 35 għal TSH. Il-konċentrazzjonijiet kollha għandhom ikunu rreġistrati f'ng/ml.

39. Jekk bażi tad-dejta storika ma tkunx adegwata, għandha tinghata konsiderazzjoni lid-determinazzjoni ta' varjabbli ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel ma jibda d-dożaġġ jew preferibbilment f'sett ta' annimali mhux inkluzi fil-gruppi ta' esperimenti.

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

40. L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika shiha u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wieċ estern tal-ġisem, tal-fethiet 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-bżieqa seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni kollha flimkien, it-timu, il-milsa, il-moħħ u l-qalb tal-annimali kollha (minbarra ta' daww misjabin moribondi u/jew li jinqatlu bl-ewtanasje qabel ma intemm l-istudju) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwagħhal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittiehed malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni biex ikun evitat it-tnixxif. Għandha tkun eżerċitata attenzjoni meta jsir it-tirqim tal-kumplex tal-prostata biex ikun evitat li jittaqqbu l-bżieqa seminali mimlijin fluwidu. Alternattivament, il-bżieqa seminali u l-prostata jistgħu jintraqmu u jintiznu wara l-fissazzjoni.

▼ M4

41. Flimkien ma' dan, żewġ tessuti oħra jistgħu, imma mhux bilfors, jintiżnu malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni, biex ikun evitat it-tnixxif: ovarji akkoppjati (piż fl-imxarrab) u l-utru, inkluż iċ-ċerviċi (il-gwida dwar it-tneħħija u l-preparazzjoni tat-tessuti tal-utru għal-kejl tal-piż hija pprovduta fit-TG 440 tal-OECD (18)).
42. Il-piż tat-tirojde (fakultattiv) jista' jiġi ddeterminat wara l-fissazzjoni. It-tirgħim għandu jsir ukoll b'reqqa kbira u biss wara l-fissazzjoni biex tkun evitata l-hsara lit-tessut. Il-hsara fit-tessut tista' tippregudika 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-lezjonijiet kbar kollha, il-mohħ (reġjuni rappreżentattivi inklużi iċ-ċerebru, iċ-ċervellet 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 bżieġaq seminali bi glandoli tal-koagullazzjoni), il-vaġina, il-bużżieqa tal-awrina, in-nodi limfatiċi [minbarra n-nodu ta' tisfija l-aktar qrib għandu jittiehed nodu limfatuġu iehor skont il-prassi tal-laboratorju (15)], in-nerv periferali (xjatiku jew tibjali) preferibbilment qrib hafna 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 jkun f'fissati b'immersjoni f'fissattiv ta' Bouin jew f'dak modifikat ta' Davidson (16) (17). It-tunika albuginea għandha tittaqab bil-mod u mhux fil-fond fiż-żewġ poli tal-organu b'labra biex jithalla jkun hemm penetrazzjoni malajr tal-fissattiv. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-htieġa li jkun 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-bżieġaq seminali bi glandoli tal-koagullazzjoni, 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 izda dan il-parametru jista' jkun sensittiv hafna għal sustanzi b'azzjoni estrogenika. L-osservazzjoni ta' organi/tessuti li mhumx 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-programm tat-test internazzjonali nkisbet xi evidenza li effetti endokrinali sottili minn kimiċi b'qawwa baxxa biex jaffettwaw l-omeostażi tal-ormon sesswali jistgħu jkun 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 iavalutat, l-istadju taċ-ċiklu kif iddeterminat minn tiċpisiet vaġinali jista' jkun inkluż ukoll f'dan il-paragun.

▼ **M4****Istopatoloġija**

47. Għandha ssir istopatoloġija shiha 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 trattati.

DEJTA U RAPPORTAR**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-hin 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.;
- pizijiet 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 omogeneità tal-preparazzjoni;

▼ M4

- dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
- konverżjoni minn dieta/konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ta' ilma tax-xorb (ppm) għad-doża attwali (mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;
- dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma.

Punti ta' tmiem fakultattivi investigati

- lista ta' punti ta' tmiem fakultattivi investigati

Riżultati:

- piż tal-ġisem/bidliet fil-piż tal-ġisem;
- konsum ta' ikel, u konsum ta' ilma, jekk applikabbli;
- dejta ta' reazzjoni tossika skont is-sess u livell ta' doża, inklużi sinjali ta' tossiċità;
- natura, severità u durata ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk reversibbli jew le);
- attività sensorja, qawwa tal-qabda u valutazzjonijiet tal-attività motorja;
- testijiet ematoloġiċi b'valuri bażi rilevanti;
- testijiet ta' bijokimika klinika b'valuri linja bażi rilevanti;
- piż tal-ġisem waqt l-ewtanasja u dejta dwar il-piżijiet tal-organi;
- sejbiet minn awtopsji;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha istopatoloġiċi;
- dejta ta' assorbiment jekk disponibbli;
- trattament ta' statistika ta' riżultati, fejn jixraq.

*Diskussjoni dwar riżultati.**Konklużjonijiet*

▼ **M4***Appendiċi 1*

DEFINIZZJONIJIET

Androġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bhal ormon androġeniku naturali (eż. testosterone) f'organizmu mammiferu.

Antiandroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon androġeniku naturali (eż. testosterone) f'organizmu mammiferu.

Antiestroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17β) f'organizmu mammiferu.

Attività tal-antitirojde hija l-kapaċità ta' kimika li trażżan l-azzjoni ta' ormon naturali tat-tirojde (eż. T₃) f'organizmu 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 bhala 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 bhala konċentrazzjoni kostanti ta' dieta.

Tossiċità evidenti huwa terminu ġenerali li jiddeskrivi sinjali ċari ta' tossiċità wara li tkun giet amministrata kimika għall-ittestjar. Dawn għandhom ikunu suffiċjenti għal valutazzjoni tal-periklu and għandhom ikunu tali li zieda 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 hażin osservat. Dan huwa l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet hżiena relatati ma' trattament ma jkunu osservati minhabba trattament.

Estroġeniċità hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bhal ormon estroġeniku naturali (eż. estradijol 17β) f'organizmu mammiferu.

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

Attività tat-tirojde hija l-kapaċità ta' kimika li taġixxi bhal ormon naturali tat-tirojde (eż. T₃) f'organizmu mammiferu.

Validazzjoni hija proċess xjentifiku mfassal biex jikkaratterizza r-rekwiżiti operattivi u l-limitazzjonijiet ta' metodu ta' ttestjar u biex juri l-affidabbiltà u r-rilevanza tiegħu għal għan partikolari.

▼ **M4***Appendiċi 2***Punti ta' tmiem rakkomandati għall-detezzjoni ta' interferenti endokrinali (EDs) f'dan il-Metodu ta' Ttestjar B.7**

Punti ta' tmiem obbligatorji	Punti ta' tmiem fakultattivi
Piż	
— Testikoli	— Ovarji
— Epididimi	— Utru, inkluż ċerviċi
— Adrenali	— Tirojde
— Prostata + bżieżaq seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni	
Istopatoloġija	
— Gonadi:	— Tiċpisiet vaginali
— Testikoli u	— Glandoli mammarji tar-raġel
— Ovarji	— Pitwitarja
— Organi sesswali aċċessorji:	
— Epididimi,	
— Prostata + bużżeġa seminali bi glandoli tal-koagulazzjoni	
— Utru, inkluż ċerviċi	
— Adrenali	
— Tirojde	
— Vaġina	
Kejl ta' ormoni	
	— Livelli ta' ċirkolazzjoni ta' T3, T4
	— Livelli ta' ċirkolazzjoni ta' TSH

LETTERATURA:

- (1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- (2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60
- (3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9: 691-704.
- (5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.

▼ **M4**

- (7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.
- (10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.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, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- (19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼ M4

B.8. TOSSICITÀ TA' INALAZZJONI SUBAKUTA: STUDJU TA' 28 JUM

SOMMARJU

Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.8 rivedut tfassal biex jikkarakterizza b'mod shih it-tossicità 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 roditori 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), hasil tal-bronkoalveolari (BAL), testijiet newroloġiċi u patoloġija klinika addizzjonali u evalwazzjonijiet istopatoloġiċi biex it-tossicità ta' kimika għall-ittestjar tkun ikkarakterizzata aħjar.

DAHLA

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) originali 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-htigijiet 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 tossicità ta' inalazzjoni subakuta tista' tintuża għal valutazzjonijiet tar-riskju kwantitattivi [jekk ma jkunux segwiti minn studju ta' 90 jum dwar tossicità 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-tossicità ta' inalazzjoni subkronika. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux maħsub speċifikament 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 tissaħħah 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-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossicità *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-tossicità ta' inalazzjoni akuta. Jekk tkun mistennija jew osservata newrotossicità waqt li jkun għaddej l-istudju, id-direttur tal-istudju jista' jagħzel li jinkludi evalwazzjonijiet xierqa bħal gaġġa funzjonali ta' osservazzjoni (FOB) u kejl ta' attività motorja. Għalkemm l-għażla sewwa tal-hin ta' espożizzjonijiet relattivi għal eżamijiet speċifiċi tista' tkun kritika, il-prestazzjoni ta' dawn l-attivitàjiet addizzjonali m'għandhiex tfixxkel id-disinn bażiku tal-istudju.

▼ **M4**

4. Id-dilwizzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar korrużivi jew irritanti jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet li għandhom jirrendu l-grad mixtieq ta' tossiċità [irreferi għal GD 39 (2)]. Meta l-annimali jkunu esposti għal dawn il-materjali, il-konċentrazzjonijiet immirati għandhom ikunu baxxi biżżejjed li ma jgħolqux uġiġh kbir u diffikultà, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilhqgħu l-għan regolatorju u xjentifiku tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jintgħazlu 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-hin ta' meta beda (ara l-paragrafi 11-13). Għandha tingħata l-gustifikazzjoni 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-tehd tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu hafna, u gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib hafna, huma s-sugġett 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 żgħażaġh f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far. Għandha tingħata gustifikazzjoni jekk jintużaw speċijiet ohra.

Preparazzjoni tal-annimali

7. Nisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal. Fil-jum li fih jintgħazlu b'mod każwali, l-annimali għandhom ikunu adulti żgħażaġh li jkunu minn 7 sa 9 ġimghat fl-età. Il-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' $\pm 20\%$ tal-piż medju għal kull sess. L-annimali jintgħazlu b'mod każwali, jiġi 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 taht il-ġilda, biex ikunu f'faċilitati l-osservazzjonijiet u tkun evitata l-konfużjoni. It-temperatura tal-kamra ta' manutenzjoni tal-annimali esperimentali għandha tkun $22 \pm 3^\circ\text{C}$. 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 jitqieghdu 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 animal u għandu jimminimizza t-telf minhabba kannibaliżmu u ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieher biss, jista' jkun jehti-ġilhom jidraw it-tubi ta' trazzin. It-tubi ta' trazzin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażzin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusku. Jekk tkun disponibbli dejta ġenerika li turi li ebda bidliet bħal dawn ma jseħħu sa certu limitu konsiderevoli, f'dak il-każ ma jkunx mehtieġ adattament minn qabel għat-tubi ta' trazzin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jingħalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jithallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' shabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċċertifikati mil-laboratorju, hlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb muniċipali. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

▼ **M4****Kmamar tal-inalazzjoni**

9. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-oġġett tat-test għandhom jittqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-modalità ppreferuta ta' espożizzjoni hija mill-imnieher biss (liema frazi tinkludi r-ras biss, l-imnieher biss, jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieher biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jiffurma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu ahjar 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-imnieher biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma indirizzati f'GD 39 (2).

STUDJI DWAR IT-TOSSICITÀ**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-htieġa li tinzamm 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 mehtieġ li daww il-limiti jinqabzu meta jkunu ttestjati gassijiet jew kimiċi għall-ittestjar volatili hafna (eż. refriġeranti). Il-konċentrazzjoni limitata għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolgot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

Studju dwar id-Detezzjoni ta' Firxa

11. Qabel ma jingħata bidu għall-istudju ewlieni, jista' jkun mehtieġ li jsir studju dwar l-detezzjoni ta' firxa. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa huwa aktar komprensiv minn studju ta' osservazzjoni minhabba li mhux limitat għal għażla ta' konċentrazzjonijiet. It-tagħlim li hemm x'wiehed jiehu 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, tehid tad-daqs ta' partielli, sejbien ta' mekkanizmi 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' jagħzel 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 oghla li hija tollerata mingħajr tensjoni bla bżonn għall-annimali, u l-parametri li għandhom jikkarakterizzaw bl-ahjar mod it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar.
12. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jikkonsisti f'livell wiehed 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 jkun 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-ghan tal-istudju ewlieni huwa li tintwera relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons ibbażata fuq dak li huwa mistenni li jkun l-aktar punt ta' tmiem sensitiv. Il-konċentrazzjoni baxxa għandha idealment tkun konċentrazzjoni ta' ebda effett ħazin osservat, filwaqt li l-konċentrazzjoni għolja għandha tislet tossiċità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolgot it-tul tal-ħajja tagħhom (3).

▼ M4

13. Meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa, l-informazzjoni kollha disponibbli għandha titqies li tinkludi relazzjonijiet ta' attività strutturata u dejta għal kimiċi simili (ara l-paragrafu 3). Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jivverifika/jirrifjuta dawk li jitqiesu li jkunu l-punti ta' tmiem l-aktar sensitivi bbażati b'mod mekkaniku, eż. inibizzjoni ta' kolinesterazi minn organofosfati, formazzjoni ta' metemoglobina minn agenti eritrocitotossici, ormoni tat-tirojde (T3, T4) għal tirotossikanti, proteina, LDH, jew newtrofili f'hasil tal-bronkoalveolari għal particejli li f'it jinhallu li ma jagħmlux hsara 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-htieġa (ara l-paragrafu 17). Id-dejta kollha disponibbli għandha tkun utilizzata bħala għajnuna fl-għażla ta' livelli adatti ta' espożizzjoni, inkluzi r-riżultati ta' studji sistemiċi ta' tossiċità, metabolizmu u kinetika (għandha ssir enfazi partikolari biex ikunu evitati livelli għoljin ta' konċentrazzjoni li jissaturaw proċessi kinetiċi). Kull grupp ta' test ikollu fih mill-anqas 10 roditori (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 ha farmaċewtiċi man-nifs). Jekk ikun magħruf li wiehed 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' roditori minbarra l-firien ikunu esposti mill-innieher 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' espożizzjoni 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 izda m'għandux jikkawża sinjali jew letalità li jdumu u li ma jhallux 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' jintuza biex ikunu osservati r-riversibbiltà, il-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' tossiċità għal perjodu ta' wara t-trattament ta' tul xieraq, izda ta' mhux anqas minn 14-il jum. Gruppi satellitarji (riversibbli) jikkonsistu f'hames irġiel u hames nisa esposti kontemporanjament mal-annimali tal-esperimenti fl-istudju ewlieni. Gruppi ta' studju satellitarju (riversibbli) għandhom ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar fl-oghla livell ta' konċentrazzjoni u għandu jkun hemm arja konkurrenti u/jew kontrolli ta' vejjikoli skont il-htieġa (ara l-paragrafu 17).

▼ **M4****Annimali tal-Kontroll**

17. L-annimali tal-kontroll negattiv (arja) konkurrenti għandhom ikunu mmanigġati b'mod identiku għall-grupp ta' annimali tat-test hliet 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-tossicità ta' vejjikolu ma' tkunx magħrufa sewwa, id-direttur tal-istudju jista' jagħzel 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 hteġa 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 tossicità, 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 tahlita tagħhom. L-istat fiziku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fizika li x'aktarx tkun preżenti matul l-immagazzinament 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-particelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex jitnaqqas id-daqs tal-particelli. Hija pprovduta gwida ulterjuri f'GD 39 (2).

Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Particelli

19. It-tehid tad-daqs tal-particelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jiffurma l-aerosols. Biex tithalla 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 gudizzju espert jekk ma jkunx jista' jintlaħaq. Pereżempju, il-particelli tad-dħaħen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u l-particelli u fibri ċċarġjati jistgħu jaqbzuh.

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-particelli, l-ilma għandu jingħata preferenza. Kull darba li kimika għall-ittestjar tinhall 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-hin reali tat-konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà temporali) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdidi mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri rilevanti u d-dinamiċi kollha tal-inalazzjoni. Jekk il-konċentrazzjoni tkun immonitorjata

▼ M4

fil-hin reali, il-frekwenza tal-kejl tal-flussi tal-arja tista' titnaqqas sa kejl wiehed ghal kull espożizzjoni ghal kull jum. Ghandha tinghata konsiderazzjoni speċjali biex tkun evitata l-inalazzjoni mill-ġdid fil-kmamar għall-immieher biss. Il-konċentrazzjoni tal-ossigenu ghandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wiehed jemmin li dan l-istandard ma jkunx jista' jitlehaq, il-konċentrazzjonijiet tal-ossigenu u tad-dijossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu. Jekk il-kejljiet fl-ewwel jum ta' espożizzjoni juru li dawn il-gassijiet ikunu ta' livelli tajbin, ma jkunux mehtieġa aktar kejljiet.

Temperatura tal-Kamra u Umdità Relattiva

22. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm $f^{22} \pm 3$ °C. L-umdià relattiva fiż-żona fejn l-annimali jiehdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-immieher biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata kontinwament u rreġistrata kull siegħa matul kull espożizzjoni meta jkun possibbli. L-umdià relattiva għandha preferibbilment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati tahlitiet abbażi ta' ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minhabba 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 tikkarakterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda hija paragon tal-konċentrazzjoni nominali u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' generazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu l-problemi ta' generazzjoni.

Kimika għall-Ittestjar: Konċentrazzjoni Attwali

24. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar kif ikun ittehdilha l-kampjun tagħha fiż-żona fejn l-annimali jiehdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu b'metodi speċifiċi (eż. tehid 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 wiehed 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'hafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analizi gravimetrika. Iżda din tehtieg 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 mehtieġa 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 jissublimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu ngabru bil-metodu magħżul.
25. Għandu jintuża lott wiehed 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-omogeneità u l-istabbiltà tiegħu. Qabel ma jinbada 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: hin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimuli 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-isponsor għall-anqas b'mod limitat (eż. lewn, natura fiżika, eċċ.).

▼ M4

26. L-atmosfera ta' espożizzjoni għandha tinzamm kostanti daqa kemm ikun prattikabbli. Jista' jintuża apparat ta' monitoraġġ f'lin reali, b'halma huwa fotometer tal-aerosol għal aerosols jew analizzatur tal-idrokarbur totali għall-fwar biex tintwera l-istabbiltà tal-kundizzjonijiet ta' espożizzjoni. Il-koncentrazzjonijiet attwali tal-kamra għandhom jitkejlu mill-anqas 3 darbiet matul kull jum ta' espożizzjoni għal kull livell ta' koncentrazzjoni. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minhabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew minhabba koncentrazzjonijiet baxxi, ikun aċċettabbli kampjun wiehed għal kull perjodu ta' espożizzjoni. Idealment, dan il-kampjun għandu mbagħad jingabar tul il-perjodu kollu ta' espożizzjoni. Il-kampjuni individwali tal-koncentrazzjoni tal-kamra jistgħu jkollhom devjazzjoni mill-koncentrazzjoni medja tal-kamra b'mhux aktar minn $\pm 10\%$ għall-gassijiet u l-fwar, u b'mhux aktar minn $\pm 20\%$ għall-aerosols likwidi jew solidi. Il-hin biex tinkiseb ekwilibrazzjoni tal-kamra (t_{95}) għandu jkun ikkalkulat u rrapportat. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-hin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata. Din tqis il-hinijiet 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 tahlitiet kumplessi hafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imħaddmin minn prodott/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 wahda (analita), normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-tahlita, ta' kull fażi (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun tahlita, il-koncentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-tahlita totali, u mhux biss għall-ingredjent attiv jew għas-sustanza indikatriċi (analita). L-informazzjoni addizzjonali dwar koncentrazzjonijiet attwali tinsab f'GD 39 (2).

Kimika għall-Ittestjar: Distribuzzjoni tad-Daqs tal-Particelli

28. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas kull ġimgħa għal kull livell ta' koncentrazzjoni billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv, b'hal-ghodda ajrudinamika li tagħti d-daqs lill-particelli (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, b'hal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża b'mod parallell mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-gabra. Il-koncentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi tad-daqs tal-particelli għandha tkun fil-limiti raġonevoli tal-koncentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi b'filtru [ara GD 39 (2)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-koncentrazzjonijiet kollha ttestjati fil-faži bikrija tal-istudju, f'dak il-każ kejljiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jithallew barra. Biex jinżamm trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittiehdu mizuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal htieġa ta' ripetizzjoni tal-istudju.
30. It-tehid tad-daqs tal-particelli għandu jsir għal fwar jekk ikun hemm xi possibbiltà li tista' tirriżulta kondensazzjoni ta' fwar fil-formazzjoni ta' aerosol, jew jekk jinstabu particelli f'atmosfera ta' fwar b'potenzjal għall-fażijiet imhallta.

OSSERVAZZJONIJIET

31. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament qabel, matul u wara l-perjodu ta' espożizzjoni. 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 hażin, jew b'atmosfera opaki, l-annimali għandhom ikunu osservati bir-reqqa wara l-espożizzjoni. L-osservazzjonijiet qabel l-espożizzjoni tal-jum li jkun imiss jistgħu jivvalutaw kwalunkwe riversibbiltà jew effetti tossiċi li jkunu marru aktar għall-agħar.

▼ **M4**

32. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'reġistri individwali miżmumin għal kull annimal. Meta l-annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-hin 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-ghajnejn, 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-temperaturi tar-rektum jista' jipprovdni evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipertermja relatati mat-trattament jew l-gheluq. Jistgħu jkunu inkluzi valutazzjonijiet addizzjonali fil-protokoll ta' studju bħal kinetika, monitoraġġ bijoloġiku, funzjoni tal-pulmun, ritenzjoni ta' materjali li f'it jinhallu li jingemgħu fit-tessut tal-pulmun, u bidliet fl-imġiba.

PIŻIJET TAL-ĠISEM

34. Il-piżijiet tal-annimali individwali għandhom jiġu rreġistrati f'it qabel l-ewwel espożizzjoni (jum)), u darbtejn fil-ġimgha wara din (pereżempju: nhar ta' Ġimgha u nhar ta' Tnejn biex juru l-irkupru matul tmiem il-ġimgha mingħajr espożizzjoni jew matul intervall tal-hin biex jippermetti valuazzjoni tat-tossicità sistematika) jew fil-mument tal-mewt jew l-ewtanażja. Jekk ma jkunx hemm effetti fl-ewwel ġimagħtejn (2), il-piżijiet tal-ġisem jistgħu jitkejju kull ġimgha għall-bqija tal-istudju. L-annimali satellitarji (riversibbli) (jekk użati) għandhom jibqgħu jintiznu kull ġimgha tul il-perjodu kollu ta' rkupru. Fi tmiem l-istudju, l-annimali kollha għandhom jintiznu f'it qabel il-qatla biex titthalla 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 ġimgha. Il-konsum tal-ilma wkoll jista' jitkejjel.

PATOLOĠIJA KLINIKA

36. Il-valutazzjonijiet tal-patoloġija klinika għandhom isiru għall-annimali kollha, inkluzi annimali ta' kontroll u satellitarji (riversibbli), meta jinqatlu. L-intervall ta' hin 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-tehid ta' kampjuni wara tmiem espożizzjoni huwa indikat għal dawk il-parametri b'nofs haġja plazmatika qasira (eż. COHb, CHE, and MetHb).
37. It-Tabella 1 telenka l-parametri ta' patoloġija klinika li generalment ikunu meħtieġa għall-istudji tossikoloġiċi kollha. L-analiżi tal-awrina ma tkunx meħtieġa abbazi ta' rutina, izda tista' ssir meta titqies utli bbażata fuq tossicità mistennija jew osservata. Id-direttur tal-istudju jista' jagħzel li jivvaluta parametri addizzjonali biex jikkarakterizza aħjar it-tossicità ta' kimika għall-ittejtjar (eż. kolinesterazi, 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 trans-peptidazi).

▼ **M4**

Tabella 1

Parametri Standard ta' Patoloġija Klinika

Ematoloġija	
Għadd ta' eritrociti	Għadd totali ta' lewkoċiti
Ematokrit	Għadd differenzjali ta' lewkoċiti
Konċentrazzjoni ta' emoglobina	Għadd ta' pjastrini
Emoglobina korpuskulari medja	Potenzjal għal emboliżmu (agħzel wiehed):
Volum korpuskulari medju	— Hin protrombin
Konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja	— Hin ta' emboliżmu
Retikuloċiti	— Hin tromboplastin parzjali
Kimika klinika	
Glukożju (*)	Aminotransferazi tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferazi
Trigliċeridi	Fosfatazi alkalina
Nitroġenu tal-urea tad-demmm	Potassju
Bilirubina totali	Sodju
Kreatinina	Kalċju
Proteina totali	Fosforu
Albumina	Klorur
Globulina	
Analizi tal-awrina (fakultattiva)	
Dehra (lewn u turbidità)	Proteina totali
Volum	Glukożju
Gravità speċifika jew ożmolalità	Demmm/ċelluli tad-demmm
pH	
(*) Minhabba li perjodu ta' sawm fit-tul jista' jintroduċi parzjalità fil-kejl tal-glukożju għall-annimali ttrattati ma' dawg 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-aħhar ġimgħa ta' espożizzjoni, jew wara sawm tul il-lejl qabel awtopsja (f'dan l-aħhar 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-hasil 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 jkun investgati sewwa bidliet ta' doża-rispons u ta' perkors ta' żmien meta jkun hemm hsara 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 dawg li jindikaw hsara lizosomali, fosfolipidożi, fibrozi u infjammazzjoni irritanti jew allergika li tista' tinkludi d-determinazzjoni ta' citokines/kejmokines proinfjammatorji. Il-kejljiet BAL ġeneralment jikkumplementaw ir-riżultati minn eżamijiet ta' istopatoloġija iżda ma jistgħux jehdulhom posthom. Gwida dwar kif isir il-hasil tal-pulmuni tinsab f'GD 39 (2).

▼ M4

PATOLOĠIJA MAKROSKOPIKA U PIŻIJET TAL-ORGANI

39. L-annimali kollha tat-test, inkluzi dawk li jmutu matul it-test jew li jitnehhew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom ikunu soġġetti għal żvinar shih (jekk ikun jista' jsir) u għal awtopsja makroskopika. Il-hin 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 awtolizi. 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 iehor 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 minhabba li ċ-ċelloli mill-irqim jistgħu jfixxlu l-evalwazzjoni istopatoloġika. It-tessuti u l-organi għandhom jitqiegħdu f'10 % ta' formalina newtralizzata jew f'fissattiv adattat iehor 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	Bżieqaq seminali
Mudullun tal-ghadam (u/jew aspirat frisk)	Nerv vertebrali (ċervikali, midtoraċiku u lumbari)
Mohh (inkluzi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellet, u medulla/mezoċefalu)	Milsa
[Għajnejn (retina, nerv ottiku) u tebgiet l-ghajnejn]	Stonku
Qalb	Testikoli
Kliwi	Timu
Laringi (3 livelli, 1 livell biex jinkludi l-baži tal-epiglotta)	Tirojde
Fwied	Trakea (mill-anqas 2 livelli inkluża 1 taqsima longitudinali tul il-karina u 1 taqsima trasversali)
Pulmun (id-denduliet kollha f'livell wieħed, inkluzi l-bronki ewlenin)	[Bużzieqa tal-awrina]
Nodi limfatiċi mir-reġjun ilarju tal-pulmun, speċjalment għal kimiċi f'particelli għall-ittestjar li f'it jinhallu. 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 nażofaringali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofaringali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT))	Il-leżjonijiet kbar kollha
Esofagu	
[Basla tax-xamm]	
Ovarji	

▼ M4

41. Il-pulmuni għandhom jitnehhew intatti, jintiżnu u jiddaħhlu b'fissattivi adatti bi pressjoni ta' 20-30 cm ta' ilma biex ikun żgurat li tinzamm l-istruttura tagħhom (5). Għandhom jingabru taqsimiet għad-denduliet kollha f'livell wiehed, inklużi l-bronki ewlenin, iżda jekk isir il-ħasil tal-pulmuni, id-dendula mhux maħsula għandha titqiegħed fit-taqsimi bi tliet livelli (mhux taqsimiet tas-serje).
42. Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas 4 livelli tat-tessuti nażofaringali, li wiehed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofaringali, (5, 6, 7, 8, 9) biex jithalla jsir eżami adegwat tal-epitelju mimli qxur, tranżizzjonali (respiratorju mhux vibranti), respiratorju (respiratorju vibranti) u tax-xamm, u tat-tessut limfatiku tat-tisfija (NALT; 10, 11). Għandhom ikunu eżaminati tliet livelli tal-laringi, u wiehed minn dawn il-livelli għandu jinkludi l-bażi tal-epiglotta (12). Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas żewġ livelli tat-trakea, inkluża taqsimi waħda longitudinali tul il-karina minn fejn il-bronki estrapulmonari jinqasmu fi tnejn u taqsimi waħda trasversali.

ISTOPATOLOGIJA

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' jagħzel li jagħmel evalwazzjonijiet istopatoloġiċi għal gruppi addizzjonali biex juri rispons ċar ta' konċentrazzjoni. Meta jintuza 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 mikroskopici.

DEJTA U RAPPORTAR

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-hin 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' jintuza kull metodu ta' statistika ġeneralment aċċettat u l-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

Rapport tat-Test

45. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, kif jixraq:

Annimali tat-test u trobbija

- Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta.

▼ **M4**

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far; Jistgħu jkunu pprovduti sors u dejta storika, jekk ikunu minn annimali esposti f'kundizzjonijiet simili ta' espożizzjoni, abitazzjoni u sawm.

— Ghadd, 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-Registru 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 jfjixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni dettaljata tal-kamra tal-inalazzjoni inkluż volum u dijametru.

— 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 omogenea tat-test.

— Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva).

— Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieher 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 (mnierher biss), jew toqol tal-annimali/kamra (ġisem kollu).

— Hin għall-ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t95).

— Ghadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli).

Dejta ta' espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni.

▼ **M4**

- Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal għol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għad-diet mill-kamra).
- Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-zona 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 rrapportati 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 jingabru 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-tehid 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' għbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs tal-partiċelli u kalkulazzjonijiet tal-MMAD u σ_g .
- Tabulazzjoni ta' dejta dwar rispons u ta' livell ta' konċentrazzjoni għal kull annimal (jiġifieri, annimali li juru sinjali ta' tossiċità, inklużi mortalità, natura, severità, iż-żmien meta jfaqqgħu u durata tal-effetti).

▼ **M4**

- Tabulazzjoni tal-pizizzjiet individwali ta' kull animal.
- Tabulazzjoni tal-konsum tal-ikel
- Tabulazzjoni ta' dejta ta' patoloġija klinika
- Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull animal, jekk disponibbli.
- Tabulazzjoni ta' kull parametru ieħor imkejjel

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

- Għandha ssir enfazi 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 setghux jitharsu;
- Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inkluzi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;
- Il-kawża probabbli tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.
- Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm hteġa li b'mod uman jinqatlu annimali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).
- L-organu/i mmirat(i) għandu/hom jiġi/u identifikat/i.
- NOAEL u LOAEL għandhom ikunu ddeterminati.

LETTERATURA:

- (1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼ **M4**

- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP u Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers 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 jhassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (GU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼ **M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

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

▼B**B.9. DOŽI REPETUTI (28 JUM) TOSSICITÀ (DERMALI)****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (A).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (B).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINCIPIJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija somministrata b'mod orali, ta' kuljum, b'doži meqjusa lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, b'doża wahda tkun użata ma kull grupp matul perjodu ta' 28 jum. Matul il-perjodu ta' l-amministrazzjoni, l-annimali huma osservati ta' kuljum sabiex ikunu skoperti sinjali tat-tossicità. Annimali li jmutu matul it-test ikollhom awtopsija tal-mewt u l-konklużjoni tat-test li l-annimali li jibqgħu hajjin ikollhom ukoll l-awtopsija ta' wara l-mewt.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**1.6.1. Preparazzjonijiet**

L-annimali huma miżmuma f'fondi sperimentali u f'kundizzjonijiet tal-ghalf għal mill-anqas hamest ijiem. Qabel it-test, annimali adulti żgħażaġh b'saħħithom huma magħżula b'mod kif jinzerta u assenjati lejn gruppi għat-trattament. Xi ftit qabel it-testijiet, il-pil huwa maqtugħ miż-żona dorsali tad-dahar ta' l-annimali tat-test. It-tqaxxir jista' jkun użat imma għandu jkun imwettaq madwar 24 siegħa qabel it-test. Ir-repetizzjoni tal-qtugħ jew tat-tqaxxir normalment ikun mehtieg f'intervalli ta' madwar darba fil-ġimgħa. Meta jsir il-qtugħ jew it-tqaxxir tal-pil, kura għandha tittiehed sabiex ikun evitat xi grif fil-ġilda li jkunu jistgħu jibdlu l-permeabbiltà tagħha. Mhux anqas minn 10 % tal-wiċċ tal-ġisem għandu jkun imnaddaf għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-piż ta' l-annimali għandu jkun meqjus meta tkun deċiża z-żona li għandha tkun imnaddfa u l-qisien kollha tal-koperta. Meta jsiru testijiet tas-solidi, li jistgħu ikunu pulverizzati jekk xieraq, is-sustanza tat-test għandha tkun b'umidità suffiċjenti bl-ilma, jew, meta mehtieg, apparat adattat sabiex jassigura kuntatt tajjeb mal-ġilda. Sustanzi likwidi tat-test huma ġeneralment użati mingħajr ma jkunu mrattba. Applikazzjoni odjerna bħala bażi ta' minn hamsa sa sebat ijiem fil-ġimgħa hija użata.

1.6.2. Kundizzjonijiet tat-test**1.6.2.1. Annimali sperimentali**

Firien jew fniek, jew fniek ta' l-indi adulti jistgħu ikunu użati. Speċje oħrajn jistgħu ikunu użati imma l-użu tagħhom ikun jehtieg ġustifikazzjoni.

▼B

Fil-bidu ta' kull test, il-medda tal-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi $\pm 20\%$ tal-valur medju kif xieraq.

1.6.2.2. *Numru u sess.*

Mill-anqas 10 annimali gerriema (hamsa femminili u hamsa maskili) għandhom ikunu użati f'kull livell ta' doża. Jekk ikunu użati femminili, dawn għandhom ikunu femminili li qatt ma weldu u li ma humiex tqal. Jekk sagrifikar interim huwa ippjanat, in-numru ta' l-annimali għandu jkun miżjud bin-numru ta' l-annimali skedati li jkunu sagrifikati qabel it-tkomplija ta' l-istudju. B'zieda, grupp satellita ta' 10 annimali (hames annimali kull sess) jistgħu ikunu ittrattati b'doża ta' livell għoli għal 28 jum u osservati għar-riversabbiltà, persistenza, jew għal okkurrenza mdewma ta' l-effetti tossiċi għal 14-il jum ta' wara t-trattament. Grupp satellita ta' 10 annimali ta' kontroll (hames annimali kull sess) huwa wkoll użat.

1.6.2.3. *Livell tad-doża*

Mill-anqas tlett livelli ta' doži huma meħtieġa bil-kontroll u mezz ta' kontroll, jekk mezz ikun użat. Il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkun ta' mill-anqas ta' sitt siegħat kuljum. Għal sustanzi amministrati bi tmiegh sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija f'hinijiet simili f'kull jum u l-livelli tad-doża għandhom ikunu aġġustati matul l-intervalli (ta' kull ġimgħa jew ta' darbtejn fil-ġimgħa) sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż ta' l-annimal. Apparti milli t-trattament tas-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ikunu trattati b'mod identiku bħal dawk suġġetti għat-test. Meta mezz ikun użat sabiex jiffacilita l-ġħoti tad-doża, l-kontrolli għandhom ikollhom doża bil-mezz bl-istess mod bħal gruppi ittrattati, u jirċievu l-istess ammont ta' mezz bħal dak li jkunu irċevew il-grupp bil-livell ta' l-ogħla doża. Il-livell ta' l-ogħla doża għandu jirriżulta f'effetti tossiċi imma ma jipproduċi l-ebda, jew f'tit, imwiet. Il-livell tad-doża l-aktar baxxa m'għandux jipproduċi xi evidenza ta' tossiċità. Meta jkun hemm estimi użabbli ta' l-espożizzjoni umana, il-livell l-aktar baxx għandu jeċċedi dan. Idealment, il-livell medju tad-doża għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi osservabbli. Jekk aktar minn doża intermedja wahda tkun użata, l-livelli tad-doża għandhom ikunu spazzjati bi gradjazzjoni ta' l-effetti tossiċi. Fil-gruppi baxxi jew intermedji u f'dawk tal-kontroll, l-inkidenza ta' xi fatalitajiet għandha tkun baxxa sabiex tippermetti ewalwazzjoni sensibbli tar-riżultati.

Jekk l-applikazzjoni tas-sustanzi tat-test tipproduċi irritazzjoni severa tal-ġilda, l-konċentrazzjonijiet għandhom ikunu mnaqqsa u dan jista' jirriżulta fi tnaqqis fil, jew fl-assenza ta', l-effetti tossiċi l-oħrajn, fil-livell għoli tad-doża. Aktar minn hekk, jekk il-ġilda tkon sofriet hsara qawwija, jista' jkun meħtieġ li jkun imwaqqaf l-istudju u li jinbeda studju ġdid b'konċentrazzjoni aktar baxxa.

1.6.2.4. *Test ta' limitazzjoni*

Jekk studju preliminari fil-livell ta' doża ta' 1 000 mg/kg, jew livell ta' doża oghla relatat ma l-espożizzjoni umana possibbli meta dan ikunu magħruf, ma jipproduċi l-ebda effetti tossiċi, aktar testijiet ma jkunu aktar meqjusa bħala meħtieġa.

1.6.2.5. *Perijodu ta' l-Osservazzjoni*

L-annimali sperimentali għandhom ikunu osservati ta' kuljum għal sinjali tat-tossiċità. Il-hin tal-mewt u ż-żmien li fih tidher jew tisparixxi t-tossiċità għandhom ukoll ikunu irreġistrati.

▼B

1.6.3. Il-proċedura

L-annimali għandhom jinżammu f'gagġeġ individwali. L-annimali jirċievu d-doża bis-sustanza tat-test idealment fis-sebat ijiem tal-ġimgħa għal perjodu ta' 28 jum. L-annimali f'xi grupp satellita skedat għall-osservazzjoni b'segwiment għandhom jinżammu għal 14-il jum iehor mingħajr trattament sabiex tkun żvelata xi irkupru minn, jew il-persistenza ta', l-effetti tossiċi. Il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkun ta' mill-anqas ta' sitt siegħat kuljum.

Is-sustanza tat-test għandha tkun applikata b'mod uniformi fuq zona li hija madwar 10 % taż-zona totali tal-wiċċ tal-ġisem. B'sustanzi ferm tossiċi, iż-zona tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas imma kemm jista' jkun miż-zona għandha tkun koperta b'saff irqieq u uniformi kemm jista' jkun possibbli.

Matul l-espożizzjoni s-sustanza tat-test tinżamm f'kontatt mal-ġilda b'garża poruża u faxxa mhux irritanti. Is-sit tat-test għandu jkun aktar kopert b'mod xieraq sabiex iżomm il-faxxex bil-garża u s-sustanza tat-test u jassiguraw li l-annimali ma jkunux jistgħu jilgħaqu u jieklu s-sustanza tat-test. Restrizzjonijiet jistgħu jintużaw sabiex jipprevjenu l-ingestjoni tas-sustanza tat-test, imma immobilizzazzjoni kompluta mhix metodu rakkommandat. Bħala alternattiva, "apparat b'għonq protettiv" jista' jkun użat.

Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, ir-residwu tas-sustanza tat-test għandu jkun imneħhi, meta prattikabbli, bl-użu ta' ilma jew xi metodu xieraq iehor tat-tindif tal-ġilda.

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati ta' kuljum u s-sinjali tossiċi irregjistrati jkunu inkluzi, meta jsir it-tfaqqiegħ, il-grad u t-tul ta' żmien tagħhom. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu tibdil fil-ġilda u l-pil, fl-ghajnejn u membrani mukożji, u anki fis-sistemi respiratorji, ċirkulatorji, awtonomiċi u tas-sistema ċentrali tan-nervituri; l-attività somatomotori u l-istil ta' l-imġieba. Il-kejl għandu jsir ta' kull ġimgħa dwar il-piż ta' l-annimali. Huwa wkoll rakkommandat li l-konsum ta' l-ikel ikun imkejjel ta' kull ġimgħa. Osservazzjonijiet regolari ta' l-annimali huma meħtieġa sabiex jassiguraw li l-annimali jkunu, sakemm ikun possibbli, mhux mitlufa mill-istudju minhabba kawżi oħrajn bħalma huma kannibalizmu, awtolożi tan-nisġa jew mitlufa. Fit-tmiem tal-perjodu ta' l-istudju, daww kollha li jkunu għadhom haġġin fil-gruppi tat-trattament mhux-satellita, jkunu maqtula u awtopsija tkun imwettqa immedjatament. Annimali moribondi u annimali f'uġiegh jew strapazz sever għandhom ikunu mneħħija meta dan ikun innutat, u maqtula sabiex tkun evitata l-moħqrija u titwettaq awtopsja ta' wara l-mewt.

L-eżami li ġejja għandha sseħħ fit-tmiem tal-perjodu tat-test għall-annimali kollha, inkluzi daww tal-kontrolli:

- 1) hematoloġija, inkluża mill-anqas il-hematokrità, l-konċentrazzjoni tal-hemaglobulini, l-ghadd ta' l-eritroċiti, l-ghadd totali u differenzjali tal-lewtoċiti, u l-kejl tal-potenzjal ta' boċċi fid-demm;
- 2) biokemistrija klinika tad-demm, inkluz mill-anqas parametru wieħed tal-fwied u tal-funzjoni tal-kliwi: aminotransferazi ta' l-alanina tas-serum (qabel kienet magħrufa bħala t-transaminażi piruvika glutamika), il-aminotransferazi aspartata tas-serum (qabel kienet magħrufa bħala t-transaminażi ossalo-aċetika glutamika), in-nitroġenu ta' l-urea, l-albumina, il-kreatinin tad-demm, il-bilirubin totali u l-protein totali tas-serum.

Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu meħtieġa għal evalwazzjoni tossikoloġika adegwata, inkluz il-kalċju, l-fosfru, l-klorid, is-sodju, l-putassa, l-glokożju tas-sawm, l-analiżi tal-lipidi, l-ormoni, l-bilanċ tal-aċidu/baži, l-metaemoglobina, l-attività kolinesterazi.

▼B

Biokemistrija klinika addizzjonali tista' tkun użata, meta meħtieġ, sabiex tkun estiża l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati.

1.6.4. **Nekopsija Grossa (awtopsija ta' wara l-mewt)**

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja shiha grossa ta' wara l-mewt. Mill-anqas il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, u t-testi għandhom ikunu miżuna niedja malajr kemm jista' jkun possibbli wara d-dissikazzjoni sabiex ikun evitat li jinxfu. Organi u ċerti nsig tal-gisem (fwied, kliewi, il-milsa (l-marrara), it-testi, l-adrenali, l-qalb, u xi organi oħrajn li juru feriti kbar jew tibdil fid-daqs) għandhom ikunu ippreservati f'medja xierqa għall-possibbiltà ta' eżami futura histopatoloġika.

1.6.5. **Eżaminazzjoni histopatoloġika**

Fil-grupp ta' doża għolja u fil-grupp ta' kontroll, l-eżaminazzjoni histoloġika għandha tkun imwettqa fuq l-organi u l-insig ippreservati. Organi u nsig li juru difetti attribwibbli għas-sustanza tat-test fil-livell ta' l-ogħla doża għandhom ikunu eżaminati fil-gruppi kollha tad-doża l-baxxa. L-annimali f'xi grupp satellita għandhom ikunu eżaminati histoloġikalment b'enfasi partikolari fuq l-organi u nsig identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi l-oħrajn ittrattati.

2. **DATA**

Id-data għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test u n-numru ta' l-annimali li jizvelaw kull tip ta' ferita.

Ir-riżultati osservati kollha għandhom ikunu evalwati b'metodu statistiku xieraq. Kwalunkwe metodu statistikali rikonossut jista' jkun użat.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. **RAPPORT TAT-TEST**

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

- id-dettalji dwar l-annimal (l-ispeċje, silta, sorsi, il-kundizzjonijiet ambjentali, dieta, eċċ.);
- kundizzjonijiet tat-test (inkluzu t-tip ta' faxex: okklussivi jew mhux okklussivi);
- il-livelli tad-doża (inkluz il-mess, jekk użat), u l-konċentrazzjonijiet;
- il-livell ta' l-ebda effett, meta possibbli;
- dettalji dwar ir-reazzjoni tossika bis-sess u d-doża;
- il-hin tal-mewt matul l-istudju jew meta l-annimali jkunu baqghu hajjin fit-terminazzjoni tat-test;
- l-effetti tossiċi jew oħrajn;
- il-hin ta' l-osservazzjoni u kull sinjal annormali u l-korsa sussegwenti tiegħu;
- dettalji dwar l-ikel u piż tal-gisem;
- testijiet hematoloġiċi użati u r-riżultati kollha;

▼B

- testijiet hematoloġiċi kliniċi użati u r-riżultati kollha;
- is-sejbiet ta' l-awtopsja ta' wara l-mewt;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet histopatoloġiċi kollha;
- trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq;
- diskussjoni tar-riżultati;
- interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (D).

4. **REFERENZI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B (E).

▼M7

B.10. TEST *IN VITRO* TA' ABERRAZZJONI KROMOŽOMIKA FIL-MAMMIFERI**INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 473 (2016) tal-OECD Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Għe żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u harsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

L-iskop tat-test *in vitro* ta' aberrazzjoni kromożomika huwa li jidentifika s-sustanzi kimiċi li jikkawżaw aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali f'kulturi ta' ċelloli tal-mammiferi (2) (3) (4). L-aberrazzjonijiet strutturali jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomiċi jew kromatidi. Tista' ssehh piloploidija (inkluża endoreduplikazzjoni) f'assaġġi tal-aberrazzjoni kromożomika *in vitro*. Filwaqt li l-anewġeni jistgħu jinduċu l-poliploidija, il-poliploidija wahedha ma tindikax potenzjal anewġeniku u tista' tindika sempliċi perturbazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli jew ċito-tossicità (5). It-test mhuwiex imfassal sabiex ikejjel l-anewplojdija. Sabiex jiġi verifikat hemmx anewplojdija, ikun rakkomandat test *in vitro* tal-mikronukleu (6).

It-test *in vitro* ta' aberrazzjoni kromożomika jista' juża kulturi ta' linji ta' ċelloli stabbiliti jew kulturi ta' ċelloli primarji ta' oriġini mill-bniedem jew minn rodituri. Iċ-ċelloli użati għandhom jintgħazlu fuq il-bażi tal-abilità ta' tkabbir fil-kultura, l-istabilità tal-karjotip (inkluż in-numru ta' kromożomi) u l-frekwenza spontanja tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi (7). Bhalissa, id-dejta disponibbli ma tippermettix li jinharġu rakkomandazzjonijiet assoluti iżda tissuggerixxi li, meta jiġu evalwati l-perikli kimiċi, huwa importanti li jiġu kkunsidrati l-istatus *p53*, l-istabilità ġenetika (karjotip), il-kapaċità ta' tiswija tad-DNA u l-oriġini (minn rodituri jew mill-bniedem) taċ-ċelloli magħżulin għall-ittestjar. Għalhekk, dawk li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar huma mhegġin jikkunsidraw l-influwenza ta' dawn il-karatteristiċi u karatteristiċi oħrajn taċ-ċelloli fuq il-prestazzjoni ta' linja ta' ċelloli fis-sejbien tal-induzzjoni ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi, peress li l-għarfien dejjem qiegħed jidjed f'dan il-qasam.

Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

It-testijiet li jsiru *in vitro* ġeneralment jirrekjedu l-użu ta' sors eżoġeniku ta' attivazzjoni metabolika sakemm iċ-ċelloli ma jkunux metabolikament kompetenti fir-rigward tas-sustanzi kimiċi tat-test. Is-sistema eżoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*. Wiehed għandu joqgħod attent li jevita kundizzjonijiet li jistgħu jwasslu għal riżultati pożittivi artifiċjali, jiġifieri hsara fil-kromożomi mhux ikkaġunata minn interazzjoni diretta bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kromożomi; tali kundizzjonijiet jinkludu bidliet fil-pH jew l-ożmolalità (8) (9) (10), interazzjoni ma' komponenti medji (11) (12) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossicità (13) (14) (15) (16).

Dan it-test jintuża sabiex jaqbad aberrazzjonijiet kromożomiċi li jistgħu jirriżultaw minn avvenimenti klastoġeniċi. L-analiżi ta' induzzjoni ta' aberrazzjoni kromożomika għandha ssir bl-użu ta' ċelloli fil-metafażi. Għalhekk, huwa essenzjali li ċ-ċelloli għandhom jiksibu l-mitozi kemm f'kulturi ttrattati kif ukoll f'dawk mhux ittrattati. Għal nanomaterjali manifatturati, jaf ikun hemm bżonn li jsiru adattamenti speċifiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar li ma jkunux deskritti fih.

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

▼ **M7****IL-PRINCĠPIJU TAT-TEST**

Il-kulturi ta' ċelloli ta' oriġini umana jew minn mammiferi oħrajn huma esposti għas-sustanza kimika tat-test kemm b'sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr dan is-sors sakemm ma jintużawx ċelloli b'kapaċità metabolizzanti adegwata (ara l-paragrafu 13). F'intervalli prestabbiliti kif xieraq wara li l-kulturi ta' ċelloli jibdew jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test, dawn jiġu ttrattati b'inibitur tal-metafażi (eż. kolċemid jew kolċisina), miġbur u mlewwen, u ċ-ċelloli tal-metafażi jiġu analizzati bil-mikroskopju għall-preżenza ta' aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u tat-tip kromozomiku

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Preparamenti***Ċelloli*

Tista' tintuża firxa ta' linji ta' ċelloli (eż. Ovarji tal-Hamster Ċiniż (CHO), pulmun tal-Hamster Ċiniż V79, Pulmun tal-Hamster Ċiniż (CHL)/IU, TK6) jew kulturi ta' ċelloli primarji, inklużi linfoċiti periferiċi tad-demem tal-bniedem jew ta' mammiferi oħrajn (7). L-ghażla tal-linji ta' ċelloli għandha tkun iġġustifikata xjentifikament. Meta jintużaw ċelloli primarji, għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-animalli, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' ċelloli primarji ta' oriġini umana meta dan ikun fattibbli u dawn għandhom jiġu kampjunati skont il-prinċipji u r-regolamenti etiċi umani. Il-linjoċiti periferiċi tad-demem tal-bniedem għandhom jinkisbu mingħand individwi żgħażaġh (madwar 18-35 sena) li ma jpejpu u li ma għandhom ebda marda magħrufa jew li ma kinux esposti riċentement għal aġenti ġenotossiċi (eż. sustanzi kimiċi, radjazzjonijiet jonizzanti) fl-ivell li jżidu l-inċidenza ta' sfond ta' aberrazzjonijiet kromozomiċi. Dan jiżgura li l-inċidenza ta' sfond ta' aberrazzjonijiet kromozomiċi tibqa' baxxa u konsistenti. L-inċidenza bażi tal-aberrazzjonijiet kromozomiċi tiżdied mal-età, u din it-tendenza hija iktar evidenti fin-nisa milli fl-irġiel (17) (18). Jekk jingabru flimkien ċelloli mingħand iktar minn donatur wieħed, għandu jiġi speċifikat l-għadd ta' donaturi. Hemm bżonn li jintwera li ċ-ċelloli nqas sa mill-bidu nett tat-trattament bis-sustanza kimika tat-test sal-kampjunar ta' ċelloli. Il-kulturi ta' ċelloli jinżammu f'fażi ta' tkabbir ta' ċelloli esponenzjali (linji ta' ċelloli) jew jiġu stimolati sabiex jinqasmu (kulturi primarji ta' linfoċiti), sabiex jesponu ċ-ċelloli fi stadji differenti ta' ċiklu ta' ċelloli, peress li jaf ma tkunx magħrufa s-sensittività tal-istadji ta' ċelloli għas-sustanzi kimiċi. Iċ-ċelloli primarji li jehtiegu stimolazzjoni b'aġenti mitoge-niċi sabiex jinqasmu ġeneralment ma jibqgħux sinkronizzati matul l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (eż. linfoċiti umani wara stimolazzjoni mitogenika ta' 48 siegħa). L-użu ta' ċelloli sinkronizzati matul it-trattament mhuwiex rakkomandat, iżda jista' jkun aċċettabbli jekk ikun iġġustifikat.

Il-kundizzjonijiet tal-media tal-kultura

Għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tal-kultura u tal-inkubazzjoni (reċipjenti tal-kultura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO₂ jekk xieraq, temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaż-żamma tal-kulturi. Il-linji ta' ċelloli għandhom jiġu verifikati b'mod regolari għall-istabilità tal-għadd ta' kromozomi modali u l-assenza ta' kontaminazzjoni tal-Mikoplasma (7) (19), u ċ-ċelloli ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati jew jekk jinbidel l-għadd ta' kromozomi modali. It-tul normali ta' ċiklu ta' ċelloli tal-linji ta' ċelloli jew il-kulturi primarji użati fil-laboratorju tat-testijiet għandu jkun stabbilit u konsistenti mal-karatteristiċi ta' ċelloli ppubblikati (20).

Preparazzjoni tal-kulturi

Linji ta' ċelloli: iċ-ċelloli huma propagati minn kulturi omm, imqegħdin fil-medium tal-kultura f'densità b'tali mod li ċ-ċelloli f'sospensjonijiet jew f'monosaffi jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali sal-hin tal-ġbir (eż. għandha tiġi evitata konfluwenza għal ċelloli li jikbru f'monosaffi).

▼ **M7**

Linfoċiti: demm shiħ ittrattat b'antikoagulant (eż. eparina) jew linfoċiti separati jiġu kulturati (eż. għal 48 siegħa għal linfoċiti umani) fil-preżenza ta' mitoġenu [eż. fitoemagglutininina (PHA) għal linfoċiti umani] sabiex tiġi indotta diviżjoni taċ-ċelloli qabel l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test.

Attivazzjoni metabolika

Għandhom jintużaw sistemi metabolizzanti eżoġeni meta jintużaw ċelloli b'kapacità metabolika endoġena inadegwata. L-iktar sistema uzata spiss li hija l-ewwel rakkomandata, sakemm ma jkunx stipulat b'mod ieħor, hija frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imhejjija mill-fwied ta' rodituri (ġeneralment frien) ittrattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (21) (22) (23) jew tahlita ta' fenobarbital u β -naftoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29). Din it-tahlita msemmija l-ahħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jnigges (30) u ntwera li hija effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidazzjoni b'funzjoni mħallta (24) (25) (26) (28). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'koncentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1 sa 2 % (v/v) iżda tista' tizzied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-użu ta' prodotti li jnaqqsu l-indiċi mitotiku, speċjalment prodotti ta' kumplessazzjoni tal-kalċju (31) għandu jiġi evitat matul it-trattament. L-għażla tat-tip u l-koncentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena jew induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi kimiċi li jiġu ttestjati.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 23). Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokoll standard, bħat-trattament f'reċipjenti tal-kultura ssiġillati (32) (33) (34). Il-preparamenti tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin.

Kundizzjonijiet tat-test*Solventi*

Is-solvent għandu jingħażel sabiex tiġi ottimizzata s-solubilità tas-sustanza kimika tat-test mingħajr ma jithalla impatt avvers fuq it-twettiq tal-assaġġ, eż. bidla fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-kultura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Huwa rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tal-kultura). Pereżempju, fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma jew is-sulfossidu tad-dimetil. Ġeneralment, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbzu l-1 % (v/v) u s-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbzu l-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk jintużaw solventi mhux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn dejta li tindika l-kompatibilità tagħhom mas-sustanzi kimiċi tat-test, is-sistema tat-test u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika fil-koncentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-dejta ta' sostenn, importanti li jiġu inkluzi kontrolli mhux ittrattati (ara l-Appendiċi 1) sabiex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduci ebda effett dannuż jew klastoġeniku.

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossicità u l-għażla tal-koncentrazzjonijiet tat-trattament

Meta wiehed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapacità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossicità eċċessiva (ara l-paragrafu 22), il-preċipitazzjoni fil-medium tal-kultura (ara l-paragrafu 23), jew bidliet ċari fil-pH jew ozmolalità (ara l-paragrafu 5). Jekk is-sustanza kimika

▼ **M7**

tat-test tikkaguna bidla ċara fil-pH tal-medium fi żmien iż-żgħir, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali sabiex jiġu evitati riżultati pożittivi artifattwali u sabiex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-kultura.

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jsiru sabiex ikun żgurat li biżżejjed ċelloli ttrattati jkunu jilhqnu l-fażi tal-mitozi waqt it-test u li t-trattamenti jsiru fil-livelli xierqa ta' ċitotossicità (ara l-paragrafi 18 u 22). Iċ-ċitotossicità għandha tiġi stabbilita b'attivazzjoni metabolika u mingħajr fl-esperiment ewlieni bl-użu ta' indikazzjoni xierqa ta' mewt u tkabbir taċ-ċelloli. Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossicità f'test inizjali tista' tkun siewja sabiex jiġu definiti ahjar il-koncentrazzjonijiet li se jrin jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex obbligatorju. Jekk isir, ma għandux isir minflok il-kejl taċ-ċitotossicità fl-esperiment ewlieni.

L-Irduppar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD) jew iż-Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC) huma metodi xierqa għall-valutazzjoni taċ-ċitotossicità f'testijiet ċitogenetiċi (13) (15) (35) (36) (55) (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli). Fil-każ ta' trattament fit-tul u hinijiet tal-kampjunar wara l-bidu tat-trattament li jkunu itwal minn darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali (jiġifieri itwal minn 3 darbiet it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli b'kollox), l-RPD jista' jissottovaluta ċ-ċitotossicità (37). F'dawn iċ-ċirkustanzi, l-RICC tista' tipprovdi kejl ahjar jew inkella l-evalwazzjoni taċ-ċitotossicità wara darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali tkun stima siewja bl-użu tal-RPD.

Għal linfoċiti f'kulturijiet primarji, filwaqt li l-indiċi mitotiku (MI) huwa kejl tal-effetti ċitotossici/ċitostatiċi, huwa influwenzat mill-hin li jiġi fih wara t-trattament, il-mitogenu użat u t-tkabbir taċ-ċiklu ċellulari possibbli. Madankollu, l-MI huwa aċċettabbli għaliex kejl oħrajn taċ-ċitotossicità jistgħu jkunu diffiċli u imprattiċi u jaf ma jkunx japplikaw għall-popolazzjoni fil-mira ta' linfoċiti li jikbru b'ħala twegħba għall-istimolazzjoni tal-PHA.

Filwaqt li l-RICC u l-RPD għal-linji ta' ċelloli u l-MI għall-kultura primarja ta' linfoċiti huma l-parametri rakkomandati taċ-ċitotossicità, indikaturi oħrajn (eż. l-integrità taċ-ċelloli, l-apoptozi, in-nekrozi, iċ-ċiklu taċ-ċelloli) jistgħu jipprovdu informazzjoni addizzjonali siewja.

Għandhom jiġu evalwati tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inklużi l-kontroll tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabilità (iċ-ċitotossicità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Ikun xi jkun it-tip taċ-ċelloli (linji ta' ċelloli jew kulturijiet primarji ta' linfoċiti), jistgħu jintużaw kulturijiet rreplikati jew kulturijiet uniċi ttrattati f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Filwaqt li l-użu ta' kulturijiet duplikati huwa rakkomandat, kulturijiet uniċi huma aċċettabbli wkoll diment li jingħata punteġġ lill-istess numru totali ta' ċelloli għal kulturijiet uniċi jew kulturijiet duplikati. L-użu ta' kulturijiet waħedhom huwa ta' rilevanza partikolari meta jiġu vvalutati iktar minn 3 konċentrazzjonijiet (ara l-paragrafu 31). Ir-riżultati miksubin fil-kulturijiet rreplikati indipendenti f'konċentrazzjoni partikolari jistgħu jingħabru flimkien għall-analiżi tad-dejta (38). Għal sustanzi kimiċi tat-test li

▼ M7

juru tossiċità baxxa jew ebda tossiċità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-tripplu normalment ikunu xierqa. Meta ssehh ċitotossiċità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin għandhom ikopru firxa minn dik iċ-ċitotossiċità produttiva kif spjegat fil-paragrafu 22 u jinkludu konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossiċità moderata u baxxa jew ebda ċitotossiċità. Hafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons wiqfin u, sabiex tinkiseb dejta f'ċitotossiċità baxxa u moderata jew sabiex tiġi studjata r-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons f'dettall, sejjer ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjoni spazjati iktar qrib xulxin u/jew iktar minn tliet konċentrazzjonijiet (kulturi wahedhom jew repliki), speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 47).

Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossiċità, l-ogħla konċentrazzjoni għandu jkollha l-għan li tikseb ċitotossiċità ta' $55 \pm 5\%$ bl-użu tal-parametri rakkomandati dwar iċ-ċitotossiċità (jiġifieri tnaqqis fl-RICC u l-RPD għal linji ta' ċelloli u tnaqqis fl-MI għal kulturi primarji ta' linfociti għal $45 \pm 5\%$ tal-kontroll negattiv parallel). Wiehed għandu joqgħod attent meta jinterpreta riżultati pożittivi li mbagħad jistgħu jinstabu li huma fil-parti superjuri ta' din il-firxa ta' ċitotossiċità ta' $55 \pm 5\%$ (13).

Għal sustanzi kimiċi tat-test ftit li xejn solubbli li mhumie x ċitotossiċi f'konċentrazzjonijiet inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, l-ogħla konċentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-ċitotossiċità ssehh f'livelli inqas mill-inqas konċentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'konċentrazzjoni wahda biss li tipproduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirriżultaw effetti artifattwali mill-preċipitat. Fil-konċentrazzjoni li tipproduċi preċipitat, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekklix it-twertiq tat-test (eż. tilwin jew punteġġar). Id-determinazzjoni tas-solubilità fil-medium tal-kultura qabel l-esperiment tista' tkun utli.

Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew ċitotossiċità li tillimita, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-inqas (39) (40) (41). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, il-prodotti ta' reazzjoni kumplessa jew il-materjal bijoloġiku (UVCB) (42), estratt ambjentali eċċ, il-konċentrazzjoni massima jaf trid tkun oghla (eż. 5 mg/ml), fin-nuqqas ta' ċitotossiċità suffiċjenti, sabiex tiżdied il-konċentrazzjoni ta' kull wiehed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (43).

Kontrolli

Għal kull hin tal-ġbir għandhom ikunu inkluzi kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 15), li jikkonsistu f'solvent wahdu fil-medium tat-trattament u trattat bl-istess mod bħall-kulturi tat-trattament.

Kontrolli pożittivi paralleli huma meħtieġa sabiex juru l-hila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' klastoġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat u l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena, meta applikabbli. Fit-Tabella 1 ta' hawn taht jingħataw xi eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv oħrajn, jekk ikunu ġġustifikati. Peress li t-testijiet *in vitro* taċ-ċelloli tal-mammiferi huma standardizzati biżżejjed, l-użu tal-kontrolli pożittivi jista' jkun limitat għal klastoġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. Diment li dan isir fl-istess hin mat-test mhux attivat bl-użu tal-istess durata tat-trattament, ir-rispons tal-kontroll pożittiv uniku sejjer juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u kemm hija responsiva s-sistema tat-test. Madankollu, trattament fit-tul (mingħajr S9) għandu jkollu l-kontroll pożittiv tiegħu stess peress li d-durata tat-trattament sejra tvarja mit-test bl-użu tal-attivazzjoni metabolika. Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'konċentrazzjoni wahda jew iktar mistennija li toffri żidiet riproduttivi u identifikabbli fuq l-isfond sabiex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test (jiġifieri l-effetti huma ċari iżda ma jikxfux minnufih l-identità tal-lametti kodifikati lill-qarrej), u r-rispons ma għandux ikun friskju minhabba ċitotossiċità li taqbez il-limiti speċifikati fil-metodu ta' testjar.

▼ **M7**

Tabella 1.

Sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati għall-valutazzjoni tal-għarfien tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi.

Kategorija	Sustanza Kimika	CASRN
1. Klastoġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika		
	Metansulfonat tal-metil	66-27-3
	Mitomiċina C	50-07-7
	4-Nitrokinolina-N-Ossida	56-57-5
	Ċitozina arabinosida	147-94-4
2. Klastoġeni li jehtieġu attivazzjoni metabolika		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ċiklofosfamid	50-18-0

PROCEDURA**Trattament bis-sustanza kimika tat-test**

Ċelloli li jipproliferaw huma ttrattati bis-sustanza tat-test fil-preżenza u fin-nuqqas ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika.

Żmien il-ġbir tal-kulturi

Għal evalwazzjoni dettaljata, li tkun mehtieġa sabiex jiġi konkluż eżitu negattiv, għandhom isiru t-tliet kundizzjonijiet sperimentali kollha kemm huma li ġejjin bl-użu ta' trattament fuq terminu qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajrha u trattament fit-tul mingħajr attivazzjoni metabolika (ara l-paragrafi 43, 44 u 45):

- Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'hin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali mindu jinbeda t-trattament (18),
- Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'hin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali mindu jinbeda t-trattament (18),
- Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti bla heda għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika sal-kampjunar f'hin għal madwar kull darba u nofs iċ-ċiklu taċ-ċelloli normali. Ċerti sustanzi kimiċi (eż. analogi nukleosidiċi) jistgħu jinqabdu iktar malajr minn hinijiet ta' trattament/kampjunar ta' itwal minn darba u nofs it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali (24).

F'każ li xi waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali ta' hawn fuq twassa għal rispons pożittiv, jaf ma jkunx hemm bżonn li jiġi investigat xi wiehed mir-regimi tat-trattament l-oħrajn.

Preparazzjoni tal-kromożomi

Il-kulturi taċ-ċelloli jiġu ttrattati b'kolċemid jew kolċisina normalment għal siegħa sa tliet sigħat qabel il-ġbir. Kull kultura ta' ċelloli tingabar u tiġi proċessata separatament għall-preparazzjoni tal-kromożomi. Il-preparazzjoni tal-kromożomi tinvolvi t-trattament ipotoniku taċ-ċelloli, il-fissazzjoni u t-tilwin. Fil-monosaffi, iċ-ċelloli mitotiċi (identifikabbli għaliex huma tondi u maqluġhin mill-wiċċ) jistgħu jkunu preżenti fl-aħħar tat-trattament ta' bejn 3 u 6 sigħat. Minhabba li

▼ **M7**

dawn iċ-ċelloli mitotiċi jistgħu jinqalgħu faċilment, jistgħu jintilfu meta jitneħħa l-medium li jkun fih is-sustanza kimika tat-test. Jekk hemm evidenza ta' zieda sostanzjali fin-numru ta' ċelloli mitotiċi meta mqabbla mal-kontrolli, xi haġa li tindika inibizzjoni mitotika, iċ-ċelloli għandhom jingabru b'centrifugazzjoni u jizdiedu lura mal-kulturi, sabiex jiġi evitat milli jintilfu ċelloli li huma f'mitozi, u f'riskju ta' aberrazzjoni kromożomika, f'hin il-gbir.

Analizi

Il-lametti kollha, inklużi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti qabel ma ssir analiżi mikroskopika għal aberrazzjonijiet kromożomiċi. Billi l-proċeduri ta' fissazzjoni spiss jirriżultaw fi proporzjon ta' ċelloli fil-metafażi li tilfu kromożomi, iċ-ċelloli li jingħaddu għandu għalhekk ikun fihom numru ta' ċentromeri ugwali għan-numru modali +/- 2.

Tal-inqas 300 metafażi mifruxin sew għandhom jingħaddu għal kull konċentrazzjoni u kontroll sabiex jiġi konkluż li sustanza kimika tat-test hija negattiva biċ-ċar (ara l-paragrafu 45). It-300 ċellola għandhom ikunu maqsumin indaqs bejn ir-replikati, meta jintużaw kulturi rreplikati. Meta jintużaw kulturi waħedhom għal kull konċentrazzjoni (ara l-paragrafu 21), għandhom jingħaddu tal-inqas 300 metafażi mifruxin sew f'din il-kultura waħedha. L-għadd ta' 300 ċellola għandu l-vantaġġ li jzid is-saħħa statistika tat-test u, barra minn hekk, rari jiġu osservati valuri zero (mistennjin li jkunu 5 % biss) (44). In-numru ta' metafażijiet magħdud in jista' jtnaqqas meta jiġu osservati numri kbar ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi u s-sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva b'mod ċar.

Għandhom jingħaddu ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali, li jinkludu u jeskludu distakki. Il-ksur u d-distakki huma definiti fl-Appendiċi 1 skont (45) (46). Aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u kromożomiku għandhom jiġu rreġistrati għalihom u jiġu kklassifikati skont is-sottotipi (ksur, skambji). Il-proċeduri li jintużaw fil-laboratorju għandhom jiżguraw li l-analiżi tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi ssir minn persuni mharrġin sew fl-ghoti ta' punteġġi u huma evalwati bejn il-pari, jekk xieraq.

Għalkemm l-għan tat-test huwa li jinkixfu aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali, huwa importanti li wiehed jirreġistra l-frekwenzi tal-poliploidija u l-endoreduplikazzjoni meta jseħhu dawn l-avvenimenti. (Ara l-paragrafu 2).

Il-profiċjenza tal-laboratorju

Sabiex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza bit-test qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi kimiċi pożittivi ta' referenza li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti u bosta kontrolli negattivi (bl-użu ta' bosta solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontrolli pożittivi u negattivi reazzjonijiet għandhom ikunu konsistenti mat-tagħrif. Dan mhuwiex applikabbli għal laboratorju li għandhom esperjenza, jiġifieri li għandhom database storika disponibbli kif definita fil-paragrafu 37.

Għandha tiġi investigata firxa ta' sustanzi kimiċi tal-kontrolli pożittivi (ara t-Tabella 1 fil-paragrafu 26) bi trattamenti qosra u twal fin-nuqqas ta' attivazzjoni metabolika, u anki bi trattamenti qasir fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, sabiex tintwera l-hila li jinqabdu sustanzi kimiċi klastoġeniċi u tiġi stabbilita l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi magħżulin sabiex jingħataw żidiet riproduttivi u marbutin mal-konċentrazzjoni fuq l-isfond sabiex jintwerew is-sensittività u l-firxa dinamika tas-sistema tat-test.

▼ **M7****Dejta storika tal-kontroll**

Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

- Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv,
- Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll negattiv (mhux ittrattat, solvent).

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontroll ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tiżdied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (44) (47). Id-database storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti izda idealment tkun tikkonsisti f'tal-inqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (48)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom (44). Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inkluzjoni u l-eskluzjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (47).

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tagħha mad-databases tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' database storika għida tal-kontroll.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi minn kultura waħedha jew is-somma tal-kulturi rreplikati kif deskritti fil-paragrafu 21. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (44) (47). Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel toħroġ mil-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħhal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 37) u evidenza ta' nuqqas ta' żball tekniku jew uman.

DEJTA U RAPPORTAR**Preżentazzjoni tar-riżultati**

Il-perċentwal ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomika strutturali għandu jiġi evalwat. L-aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u kromożomiku kklassifikat skont is-sottotipi (ksur, skambji) għandhom jiġu elenkati b'mod separat bin-numri u l-frekwenzi tagħhom għall-kulturi ta' esperimenti u ta' kontroll. Id-distakki jiġu rreġistrati u rrapportati separatament u ma jiddaħhlux fil-frekwenza ta' aberrazzjonijiet totali. Il-perċentwal ta' poliploidija u/jew ċelloli endoreduplikati jiġi rrapportat meta jiġi osservat.

Għandhom jiġu rreġistrati l-miżuri paralleli ta' ċitotossicità għall-kulturi tal-kontroll ittrattat, negattiv u pożittiv kollha fl-esperiment(i) tal-aberrazzjonijiet ewlenin.

Għandha tiġi pprovduta dejta dwar il-kultura individwali. Barra minn hekk, id-dejta kollha għandha tingabar taħt forma ta' tabella.

Kriterji ta' Aċċettabilità

L-aċċettazzjoni ta' test hija bbazata fuq il-kriterji li ġejjin:

- Il-kontroll negattiv parallel jitqies aċċettabbli għaż-żieda fid-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 39.

▼ **M7**

- Il-kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 26) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' daww iġġenerati fid-database storika tal-kontrolli pożittivi u jipproduċu zieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv paralleli.
- Il-kriterji ta' proliferazzjoni taċ-ċelloli fil-kontroll tas-solventi għandhom ikunu ssodisfati (paragrafi 17 u 18).
- It-tliet kundizzjonijiet sperimentali kollha kemm huma ġew ittestjati sakemm wiehed ma rriżultax f'riżultati pożittivi (ara l-paragrafu 28).
- Hemm numru adegwat ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet li huma analizzabbli (paragrafi 31 u 21).
- Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' daww deskritti fil-paragrafi 22, 23 u

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati (ara l-paragrafu 28):

- a) tal-inqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi zieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv paralleli,
- b) iż-żieda hija marbuta mad-doża meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- c) kwalunkwe wiehed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 39).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli kulturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktir metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (49) (50) (51).

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali analizzati kollha (ara l-paragrafu 28):

- a) l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi zieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv paralleli,
- b) ma hemm l-ebda zieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- c) ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 39).

Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi f'ċelloli kulturati tal-mammiferi f'din is-sistema tat-test.

Ma hemm l-ebda hteġa għall-verifika ta' rispons positivi jew negattiv ċar.

F'każ li r-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq jew sabiex tghin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-dejta għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. L-ikklassifikar ta' ċelloli addizzjonali (fejn xieraq) jew it-tweġiq ta' esperiment ripetut possibbilment bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment (eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet, kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika oħrajn (jiġifieri konċentrazzjoni S9 jew oriġini S9)) jista' jkun siewi.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' dejta sejjer jipprekludi l-hruġ ta' konkluzjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, ir-rispons tas-sustanza kimika tat-test sejjer jiġi konkluz bħala ekwivoku.

▼ **M7**

Żieda fin-numru ta' ċelloli poliplojdi tista' tindika li s-sustanzi kimiċi tat-test għandhom il-potenzjal li jinibixxu l-proċess mitotiċi u jwasslu aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi (52). Żieda fin-numru ta' ċelloli bi kromożomi endoreduplikati tista' tindika li s-sustanzi kimiċi tat-test għandhom il-potenzjal li jinibixxu l-progress taċ-ċiklu taċ-ċelloli (53) (54) (ara l-paragrafu 2). Għaldaqstant, l-inċidenza ta' ċelloli poliplojdi u ċelloli bi kromożomi endoreduplikati għandha tiġi rreġistrata b'mod separat.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test:

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli
- l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk magħrufa;
- is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk magħrufin;
- il-kejl tal-pH, l-ożmolalità u l-preċipitat fil-medium tal-kultura li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet:

- ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solventi:

- ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent.
- il-perċentwal ta' solvent fil-medium tal-kultura finali għandu jiġi indikat ukoll.

Ċelloli:

- tip u sors taċ-ċelloli
- karatteristiċi karjotipiċi u l-adegwatezza tat-tip ta' ċellola użat;
- in-nuqqas ta' mikoplażma, għal-linji ta' ċelloli;
- għal-linji ta' ċelloli, informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċellola, il-hin għall-irduppjar jew l-indiċi tal-proliferazzjoni;
- is-sess tad-donaturi tad-demem, l-età u kwalunkwe informazzjoni rilevanti dwar id-donatur, id-demem shih jew il-linfoċiti separati, il-mitoġenu użat;
- in-numru ta' passaġġi, jekk disponibbli, għal-linji ta' ċelloli;
- il-metodi għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli, għal-linji ta' ċelloli;
- in-numru modali ta' kromożomi, għal-linji ta' ċelloli.

▼ **M7***Kundizzjonijiet tat-test:*

- l-identità tal-inibitur tal-metafażi, il-konċentrazzjoni tiegħu u d-durata tal-esponiment taċ-ċelloli;
- il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tal-kultura (eż. µg jew mg/mL jew mM tal-medium tal-kultura).
- ir-raġuni prinċipali għall-ghażla tal-konċentrazzjonijiet u l-ghadd ta' kulturi inkluzi, eż. dejta dwar iċ-ċitotossicità u limitazzjonijiet tas-solubilità;
- il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni tas-CO₂ jekk applikabbli, il-livell ta' umdità;
- il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) ta' solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tal-kultura;
- it-temperatura ta' inkubazzjoni;
- il-hin ta' inkubazzjoni;
- id-durata tat-trattament;
- il-hin tal-ġbir wara t-trattament;
- id-densità taċ-ċelloli fiż-żriegħ, jekk xieraq;
- it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-tahlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' tahlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tal-kultura finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9);
- is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali għal kull kundizzjoni tat-trattament;
- il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti u t-teknika użata għat-tilwin;
- il-kriterji għall-aċċettabilità tal-assaġġi;
- il-kriterji għall-ikklassifikar tal-aberrazzjonijiet;
- in-numru ta' metafażijiet analizzati;
- il-metodi għall-kejl taċ-ċitotossicità;
- kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossicità u l-metodu użat;
- il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;
- il-metodi użati sabiex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità u l-preċipitazzjoni.

Ir-riżultati:

- l-ghadd ta' ċelloli ttrattati u l-ghadd ta' ċelloli miġburin għal kull kultura meta jintużaw il-linji ta' ċelloli
- il-kejl taċ-ċitotossicità, eż. RPD, RICC, MI, osservazzjonijiet oħrajn, jekk ikun hemm;
- informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli, il-hin għall-irduppjar jew l-indiċi tal-proliferazzjoni fil-każ tal-linji ta' ċelloli;
- is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-hin tad-determinazzjoni;

▼ M7

- id-definizzjoni għall-aberrazzjonijiet, inklużi d-distakki;
- In-numru ta' ċelloli kklassifikati, in-numru ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi u t-tip ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi mogħtijin b'mod separat għal kull kultura ttrattata u tal-kontroll, inklużi u esklużi d-distakki;
- bidliet fil-ploidija (ċelloli poliplojdi u ċelloli bi kromożomi endoreduplikati, mogħtijin b'mod separat), jekk jiġu osservati;
- ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,
- id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) parallel;
- id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv, b'meded, medji u devjazzjonijiet standard u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll in-numru ta' dejta;
- analizijiet statistiċi, il-valuri p, jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konkluzjonijiet.

TAGHRIF

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) (1976), "Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens", in Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), "The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture" fi *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al.* (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. *et al.* (2008), "Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.
- (6) Il-Kapitolu B.49 ta' dan l-Anness: *Test In Vitro tal-Mikronukleu ta' Ċelloli tal-Mammiferi*.
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. *et al.* (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.
- (9) Morita, T. *et al.* (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼ M7

- (11) Long, L.H. *et al.* (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (12) Nesslany, F. *et al.* (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.
- (14) Kirkland, D. *et al.* (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1-256.
- (15) Greenwood, S. *et al.* (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36-44.
- (16) Hilliard, C.A. *et al.* (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316-326.
- (17) Hedner K. *et al.* (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. *et al.* (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.
- (19) Coecke S. *et al.* (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.
- (20) Henderson, L. *et al.* (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. *et al.* (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.
- (25) Ong, T.-m. *et al.* (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.
- (26) Elliot, B.M. *et al.* (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼ M7

- (27) Matsushima, T. *et al.* (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems" in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. *et al.* (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pp. 51-59.
- (30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponibbli fuq: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooley (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids" in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. *et al.* (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (34) Asakura, M. *et al.* (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (35) Lorge, E. *et al.* (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (36) Galloway, S. *et al.* (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.
- (38) Richardson, C. *et al.* (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. Fi: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponibbli fuq talba.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼ **M7**

- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchemicals/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponibbli fuq: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. *et al.* (1990), “Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*”, in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. *et al.* (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (51) Richardson, C. *et al.* (1989), “Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays”, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Anewplojdija: kwalunkwe devjazzjoni mill-ġhadd ta' diploidji (jew aploidji) normali ta' kromożomi minn kromożomu wiehed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliploidija).

Apoptożi: mewta programmata taċ-ċelloli kkaratterizzata minn sensiela ta' passi li jwasslu għal diżintegrazzjoni taċ-ċelloli fil-partikoli mwahhlin mal-membrana li mbagħad jiġu eliminati permezz ta' fagoċitożi jew permezz ta' tixrid.

Proliferazzjoni taċ-ċelloli: zieda fl-ġhadd ta' ċelloli bħala riżultat ta' diviżjoni mitotika taċ-ċelloli.

Sustanza kimika: sustanza jew tahlita.

Ksur tal-kromatid: diskontinwità ta' kromatid wiehed fejn ikun hemm nuqqas ta' allinjament ċar ta' wiehed mill-kromatidi.

Distakk kromatidu: reġjun mingħajr tilwin (leżjoni akromatika) ta' kromatid wiehed fejn ikun hemm nuqqas minimu ta' allinjament tal-kromatid.

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

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

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

Konċentrazzjonijiet: irreferi għal konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tal-kultura.

Ċitotossiċità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar li jużaw linji ta' ċelloli, iċ-ċitotossiċità hija identifikata bħala tnaqqis fl-irduppar relattiv tal-popolazzjoni (RPD) jew iż-żieda relattiva fl-ġhadd taċ-ċelloli (RICC) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 17 u l-Appendiċi 2). Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar li jużaw kulturi primarji ta' linfociti, iċ-ċitotossiċità hija identifikata bħala tnaqqis fl-indiċi mitotiku (MI) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 18 u l-Appendiċi 2).

Endoreduplikazzjoni: proċess li bih wara perjodu S tar-replikazzjoni tad-DNA, in-nukleu ma jidholx f'mitozi iżda jibda perjodu S ieħor. Ir-riżultat huwa kromożomi b'4, 8, 16,... il-kromatid.

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jkopri t-tipi kollha hsara lid-DNA jew lill-kromożomi, inkluzi ksur, thassiriet, addotti, modifiki u konnessjonijiet tan-nukleotidi, riarrangamenti, mutazzjonijiet tal-ġeni, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u aneuploidija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew hsara fil-kromożomi stabbli.

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

Mitozi: diviżjoni tan-nukleu taċ-ċelloli li normalment jinqasam fi profaži, prometafaži, metafaži, anafaži u telofaži.

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

▼ **M7**

Aberrazzjoni numerika: bidla fin-numru ta' kromozomi min-numru karatteristku normali ta' ċelloli użati.

Poliploidija: aberrazzjonijiet kromozomiċi numeriċi f'ċelloli jew organiżmi li jinvolvu sett(ijiet) shih(shah) ta' kromozomi, għall-kuntrarju ta' kromozomu jew kromozomi individwali (anewploidija).

Status p53: il-proteina p53 hija involuta fir-regolamentazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli, l-apoptożi u t-tiswija tad-DNA. Ċelloli b'defiċjenza fil-proteina p53 funzjonali, li mhux kapaċi jinibixxu ċ-ċiklu taċ-ċelloli jew jelimintaw iċ-ċelloli bil-ħsara b'apoptożi jew mekkaniżmi oħrajn (eż. induzzjoni tat-tiswija tad-DNA) marbutin mal-funzjonijiet p53 frispons għall-ħsara fid-DNA, teoretikament għandhom ikunu iktar suxxettibbli għal mutazzjonijiet tal-ġeni jew aberrazzjonijiet kromozomiċi.

Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC): iż-żieda fin-numru ta' ċelloli f'kulturi esposti għas-sustanza kimika kontra żieda f'kulturi mhux ittrattati, proporzjon espress bħala perċentwal.

Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD): iż-żieda fin-numru ta' raddoppji tal-popolazzjoni f'kulturi esposti għas-sustanza kimika kontra żieda f'kulturi mhux ittrattati, proporzjon espress bħala perċentwal.

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

Tahlita ta' F9: tahlita tal-frazzjoni tal-fwied S9 u l-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metabolici.

Kontrolli tas-solvent: Terminu ġenerali li jiddefinixxi l-kulturi tal-kontroll li jirċievu s-solvent wahdu użat sabiex jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test.

Aberrazzjoni strutturali: bidla fl-istruttura tal-kromozomi li wiehed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku tal-istadju metafaziku tad-diviżjoni taċ-ċelluoli, osservati bħala thassir u biċċiet, bidliet minn gewwa u bidliet bejniethom.

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

Kontrolli mhux ittrattati: kulturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri ebda sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) iżda jiġu pproċessati fl-istess hin bl-istess mod bħall-kulturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

▼ **M7***Appendiċi 2***FORMOLI GHALL-VALUTAZZJONI TAČ-ĊITOTOSSIČITÀ****Indiċi mitotiku (MI):**

$$\text{MI}(\%) = \frac{\text{Number of mitotic cells}}{\text{Total number of Cells scored}} \times 100$$

Iż-Żieda Relattiva fl-Ghadd tač-Ċelloli (RICC) jew **l-Irduppjar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD)**, minhabba li t-tnejn iqisu l-proporzjon tal-popolazzjoni tač-ċelloli li tkun iddividiet ruhha.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{No. of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

fejn:

Irduppjar tal-Popolazzjoni = $[\log (\text{Numru ta' ċelloli wara t-trattament} \div \text{Numru ta' ċelloli inizjali})] \div \log 2$

Pereżempju, RICC, jew RPD ta' 53 % jindikaw ċitotossiċità/ċitostażi ta' 47 % u ċitotossiċità/ċitostażi ta' 55 % imkejla bl-MI tfisser li l-MI attwali huwa 45 % tal-kontroll.

Fi kwalunkwe każ, l-ghadd ta' ċelloli qabel it-trattament għandu jitkejjel u l-istess għal kulturi ttrattati u tal-kontroll negattiv.

Filwaqt li l-RCC (jiġifieri n-Numru ta' ċelloli f'kulturi tat-trattament/ Numru ta' ċelloli f'kulturi tal-kontroll) intuża bħala parametru tač-ċitotossiċità fl-imghoddi, illum ma għadux rakkomandat għaliex jista' jissottovaluta č-ċitotossiċità

Fil-kulturi tal-kontroll negattiv, l-irduppjar tal-popolazzjoni għandu jkun kompatibbli mar-rekwiżit li jittiehed kampjun tač-ċelloli wara t-trattament fi żmien ekwivalenti għal madwar darba u nofs it-tul normali tač-ċiklu tač-ċelloli u l-indiċi mitotiku għandu jkun għoli biżżejjed sabiex jinkiseb numru suffiċjenti ta' ċelloli fil-mitożi u sabiex jiġi kkalkolat b'mod affidabbli tnaqqis ta' 50 %.

▼M7

B.11. TEST TAL-ABERRAZZJONI FIL-KROMOŽOMI TAL-MUDULLUN TAL-MAMMIFERI

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 475 (2016) tal-OECD Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Għe żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u harsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

It-test *in vivo* tal-aberrazzjoni fil-kromożomi tal-mudullun tal-mammiferi huwa ta' rilevanza partikolari għall-valutazzjoni tal-ġenotossicità għaliex, għad li jvarja bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetiċi u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-risponsi. Assaġġ *in vivo* huwa siewi wkoll sabiex tkun tista' ssir investigazzjoni ulterjuri tal-ġenotossicità żvelata minn sistema *in vitro*.

It-test *in vivo* ta' aberrazzjoni kromożomika fil-mammiferi jintuża sabiex jinstabu aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali indotti mis-sustanzi kimiċi tat-test fiċ-ċelloli tal-mudullun tal-annimali, normalment roditori (2) (3) (4) (5). L-aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomiċi jew kromatidi. Filwaqt li l-maġġoranza ta' aberrazzjonijiet ġenotossici indotti bis-sustanzi kimiċi huma tat-tip kromatid, jistgħu jseħħu aberrazzjonijiet tat-tip kromożomiku wkoll. Il-ħsara kromożomika u l-avvenimenti relatati huma l-kawża ta' ħafna mard ġenetiku fil-bniedem u hemm evidenza sostanzjali li, meta dawn il-leżjonijiet u l-avvenimenti relatati jikkawgunaw alterazzjonijiet f'onkoġeni u f'ġeni li jrażżnu t-tumuri, dawn ikunu involuti fil-ħolqien tal-kanċer fil-bniedem u sistemi sperimentali. Tista' sseħħ piloploidija (inkluża endoreduplikazzjoni) f'assaġġi tal-aberrazzjoni kromożomika *in vivo*. Madankollu, zieda fil-ploidija wahedha ma tindikax potenzjal anewġeniku u tista' tindika sempliċi perturbazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli jew ċitotossicità. It-test mhuwiex imfassal sabiex ikejjel l-anewploidija. Test *in vivo* tal-mikronukleu fl-eritroċiti mammiferi (Kapitolu B.12 ta' dan l-Anness) jew it-test *in vitro* tal-mikronukleu taċ-ċelloli tal-mammiferi (Kapitolu B.49 ta' dan l-Anness) ikunu t-testijiet *in vivo* u *in vitro*, rispettivament, rakkomandati għas-sejbien ta' anewploidija.

Id-definizzjonijiet tat-terminoloġija użata huma stabbiliti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

F'dan it-test spiss jintużaw roditori, iżda f'ċerti każijiet jista' jkun hemm speċijiet oħrajn li jkunu xierqa, jekk ikunu għustifikati xjentifikament. Il-mudullun huwa t-tessut fil-mira ta' dan it-test, peress li huwa tessut ferm vaskularizzat u fih popolazzjoni ta' ċelluli b'ċiklu rapidu li jistgħu jkunu faċilment iżolati u pproċessati. Fir-rapport għandha tiġi pprovdata ġustifikazzjoni xjentifika meta jintużaw speċijiet oħrajn li mhuwiex firien u grieden. Jekk jintużaw speċijiet oħrajn li mhuwiex roditori, huwa rakkomandat li l-kejl tal-aberrazzjoni kromożomika tal-mudullun jiġi integrat f'test xieraq iehor tat-tossicità.

Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, mhuwiex sejr in jilhq u t-tessut fil-mira, jaf ma jkunx xieraq li jintuża dan it-test.

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

▼ **M7****IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR**

L-annimali huma esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' rotta xierqa ta' esponiment u jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju fi żmien xieraq wara t-trattament. Qabel l-ewtanazija, l-annimali jiġu ttrattati b'inibitur tal-metafażi (eż. kolċisina jew kolċemid). Imbagħad isiru preparazzjonijiet tal-kromozomi miċ-ċelloli tal-mudullun u dawn jitlewnu, u ċ-ċelluli fil-metafażi jiġu analizzati għal aberrazzjonijiet kromozomiċi.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU**Investigazzjonijiet tal-Profiċjenza**

Sabiex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza fit-twettiq tal-assaġġ qabel ma jintuza għal testijiet ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun wera li għandu l-hila li jirri-produċi r-riżultati mistennijin mid-dejta ppubblikata (eż. (6)) għal frekwenzi ta' aberrazzjonijiet kromozomatiċi b'tal-inqas żewġ sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (inkluzi risponsi dgħajfin indotti minn dozi baxxi ta' kontrolli pożittivi), bħal daww elenkati fit-Tabella 1 u b'kontrolli tal-veikolu/solvent kompatibbli (ara l-paragrafu 22). Dawn l-esperimenti għandhom jużaw dozi li jagħtu żidiet riproduttibbli u relatati mad-dozi u juru s-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test fit-tessut ta' interess (il-mudullun) u jużaw il-metodu tal-punteġġ li sejjer jithaddem fil-laboratorju. Dan ir-rekwiżit mhuwiex applikabbli għal laboratorji li għandhom esperjenza, jiġifieri li għandhom database storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 10-14.

Dejta Storika tal-Kontroll

Matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza, il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storika tal-kontroll pożittiv, u

— Medda u distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv.

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontroll ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tizdied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni storika tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni. Id-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju għandha tkun statistikament robusta sabiex tiġi żgurata l-hila tal-laboratorju sabiex jivvaluta d-distribuzzjoni tad-dejta tal-kontroll negattiv tiegħu. It-tagħrif jissuġġerixxi li jista' jkun hemm bżonn ta' minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment ikun hemm tal-inqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragunabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (7)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija “taht kontroll” fil-laboratorju tagħhom. Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inkluzjoni u l-eskluzjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (8).

Meta l-laboratorju ma jagħmilx numru kbir biżżejjed ta' esperimenti sabiex jistabbilixxi distribuzzjoni statistikament robusta tal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 11) matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza (deskritti fil-paragrafu 9), jista' jiġi aċċettat li d-distribuzzjoni tinbena matul l-ewwel testijiet ta' rutina. Dan l-approċċ għandu jsegwi r-rakkomandazzjonijiet stipulati fit-tagħrif (8) u r-riżultati tal-kontroll negattiv miksubin f'dawn l-esperimenti għandhom jibqgħu konsistenti mad-dejta ppubblikata tal-kontroll negattiv.

▼ **M7**

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-impatt tagħha fuq kemm id-dejta li tirrizulta tibqa' konsistenti mad-database storika eżistenti tal-kontroll tal-laboratorju. Inkonsistenzi kbar biss għandhom jirrizultaw fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll, fejn il-ġudizzju tal-esperti jistabbilixxi li tvarja mid-distribuzzjoni ta' qabel (ara l-paragrafu 11). Matul l-istabbiliment mill-ġdid, jaf ma jkunx hemm bżonn ta' database shiha tal-kontroll negattiv sabiex ikun jista' jsir test propju, diment li l-laboratorju jkun jista' juri li l-valuri tal-kontroll negattiv parallel tiegħu jibqgħu konsistenti mad-database ta' qabel jew mad-dejta ppubblikata korrispondenti.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza tal-aberrazzjoni kromożomika strutturali (eskluzi d-distakki) f'kull annimal. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju. Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel tohroġ mil-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħhal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 11) u ebda evidenza ta' żball tekniku jew uman.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Preparamenti***Għażla ta' speċi tal-annimali*

Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali żgħar b'saħ-hithom. Il-firien jintużaw l-iktar spiss, għad li l-ġrieden jistgħu jkunu adattati wkoll. Tista' tintuża kwalunkwe speċi ta' mammiferi xierqa ohra, jekk tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika fir-rapport.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

Għar-rodituri, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C ($\pm$ 3 °C). Għad li, idealment, l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun tal-inqas 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % hlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata tahlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tinghata minn din ir-rotta. Ir-rodituri għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (mhux iktar minn hamsa f'gagġa) tal-istess sess u grupp tat-trattament jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva, idealment f'gagġeġ solidi mal-art bl-arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew wahedhom biss jekk dan ikollu ġustifikazzjoni xjentifika.

Preparazzjoni tal-annimali

Normalment jintużaw annimali adulti żgħar b'saħhithom (għal rodituri, idealment 6-10 ġimghat fil-bidu tat-trattament, għad li jistgħu jiġu aċċettati annimali f'it ixjah ukoll), u dawn jiġu assenjati b'mod aleatorju għall-gruppi tal-kontroll u tat-trattament. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu umanitarju u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'cirku madwarhom, tikketti, mikro-ċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fil-widnejn jew fis-swaba) u jithallew iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas hamest ijiem. Il-gagġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minhabba t-tqegħid tal-gagġeġ. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u s-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx $\pm$ 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-dożi

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospizi f'solventi jew veikoli xierqa jew jithalltu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew

▼ M7

jigħu dilwiti qabel id-dożagġ. Għal esponimenti bit-tehid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprietajiet fizikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati godda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Solvent/veikolu

Is-solvent/veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użati, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inkluzjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metil-ċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetilċelluloża, żejt taż-zebbuġa u żejt tal-qamħirrum. Fin-nuqqas ta' dejta storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huma indotti ebda aberrazzjoni strutturali jew effetti dannuż iehor minn solvent/veikolu atipiku magħżul, għandu jsir studju inizjali sabiex tiġi stabbilita l-aċċettabilità tal-kontroll tas-solvent/veikolu.

Kontrolli*Kontrolli pożittivi*

Normalment għandu jkun inkluzjoni grupp ta' annimali ttrattati b'sustanza kimika tal-kontroll pożittiv ma' kull test. Dan jista' jiġi rrinunzjat meta l-laboratorju tal-ittestjar ikollu profiċjenza murija fit-tweġġ tat-test u jkun stabbilixxa medda storika tal-kontroll pożittiv. Meta ma jkunx hemm grupp tal-kontroll pożittiv parallel inkluzjoni, il-kontrolli tal-punteġġ (lametti fissi u mhux imlewnin) għandhom ikunu inkluzi f'kull esperiment. Dawn jistgħu jinkisbu billi fl-ikklassifikar tal-istudju jiddaħhlu kampjuni ta' referenza xierqa li nkisbu u nħażnu minn esperiment tal-kontroll pożittiv separat imwettaq b'mod perijodiku (eż. kull 6-18-il xahar) fil-laboratorju fejn isir it-test; pereżempju, matul l-ittestjar tal-profiċjenza u fuq bazi regolari wara, fejn ikun hemm bżonn.

Is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom jipproduċu b'mod affidabbli zieda identifikabbli fil-frekwenza taċ-ċelloli b'aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali fuq il-livell spontanju. Id-dożi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħazlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tal-kampjuni kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettabbli li l-kontroll pożittiv jingħata b'rotta differenti mis-sustanza kimika tat-test, bl-użu ta' skeda tat-trattament differenti, u li l-kampjunar isehh biss f'waqt partikolari biss. Barra minn dan, jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv relatati mal-klassi tas-sustanzi kimiċi, meta xieraq. Fit-Tabella 1 hemm inkluzi eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv.

*Tabella 1***Eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv**

Sustanza Kimika	CASRN
Metansulfonat tal-etil	62-50-0
Metansulfonat tal-metil	66-27-3
Nitrosurea tal-etil	759-73-9
Mitomicina C	50-07-7
Ċiklofosfamida (monoidrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelamina	51-18-3

▼ **M7***Kontrolli negattivi*

L-annimali tal-grupp tal-kontroll negattiv għandhom ikunu inklużi f'kull hin tal-kampjunar u l-bqija jiġu mmanigġjati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, hlief li ma jirċivux trattament bis-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent/-veikolu fl-ghoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi dan is-solvent/il-veikolu. Madankollu, jekk jintwera li hemm varjabbiltà konsistenti bejn l-annimali u frekwenzi ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet strutturali permezz ta' dejta storika tal-kontroll negattiv f'kull waqt tal-kampjunar għal-laboratorju tal-ittestjar, jaf ikun hemm bżonn ta' kampjunar wiehed biss għall-kontroll negattiv. Meta jintuża kampjunar wiehed għall-kontrolli negattivi, għandu jkun l-ewwel waqt tal-kampjunar użat fl-istudju.

PROCEDURA**In-numru u s-sess tal-annimali**

B'mod ġenerali, ir-rispons tal-mikronukleu huwa simili bejn l-annimali rġiel u nisa (9) u mhuwiex mistenni li dan sejjer isehh ukoll għal aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali; għalhekk, hafna mill-istudji jistgħu jsiru f'kull sess. Dejta li turi d-differenzi rilevanti bejn l-irġiel u n-nisa (eż. differenzi fit-tossicità sistemika, il-metabolizmu, il-bijodisponibilità, it-tossicità tal-mudullun, eċċ. inkluz, eż. studju għat-tiftix tal-medda) thegħeġ l-użu taż-żewġ sessi. F'dan il-każ, jaf ikun xieraq li jsir studju fiż-żewġ sessi, eż. bħala parti minn studju ripetut tat-tossicità tad-doża. Jaf ikun xieraq li jintuża d-disinn fattorjali f'każ li jintużaw iż-żewġ sessi. Dettalji dwar kif tiġi analizzata d-dejta bl-użu ta' dan id-disinn huma mogħtijin fl-Appendiċi 2.

Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju għandhom jiġu stabbiliti bil-għan li jiġu pprovduti tal-inqas 5 annimali analizzabbli ta' sess wiehed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn, għal kull grupp. Fejn l-esponiment umani għas-sustanzi kimiċi tista' tkun speċifika għas-sess, bħal ma jsehħ pereżempju għal ċerti prodotti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq. Bħala gwida għal rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju fil-mudullun f'żewġ waqti tal-kampjunar bi tliet gruppi tad-doża u grupp tal-kontroll negattiv parallel, flimkien ma' grupp tal-kontroll pożittiv (kull grupp imsawwar minn hames annimali ta' sess uniku), ikun jehtieġ 45 annimal.

Livelli tad-doża

Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda dejta xierqa diġà disponibbli sabiex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jrid jintuża fl-istudju ewlieni (10). L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala l-ogħla doża li sejra tiġi tollerata mingħajr evidenza ta' tossicità li tillimita l-istudju, b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, billi tiġi indotta dipressjoni tal-piż tal-ġisem jew ċitotossicità tas-sistema ematopoetika), iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigh, tbatija jew diffikultà li jehtieġu ewtanazja umanitarja (11).

L-ogħla doża tista' tiġi definita wkoll bħala doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossicità għall-mudullun.

Sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni tal-proprietajiet tossikokinetiċi, jew jinduċu proċessi ta' ditossifikazzjoni li jistgħu jwasslu għal tnaqqis fl-esponiment wara trattament fit-tul jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' ssettar tad-doži u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

Sabiex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju shih għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv u tal-inqas tliet livelli ta' doži ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda mhux ikbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċi tossicità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-baži tad-dejta eżistenti, l-ogħla doża għal amministrazzjoni wahda għandha tkun ta' 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaguna tossicità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossicità jew

▼ **M7**

ebda tossiċità. Meta tiġi osservata tossiċità tat-tessut fil-mira (il-mudullun) fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, huwa rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'doži mhux tossiċi. Studji li jkollhom l-ghan li jikkarakterizzaw iktar bis-shih l-informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża jistgħu jehtieġu gruppi tad-doża addizzjonali. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn rekwiżiti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw.

Test tal-limitu

Jekk l-esperimenti għat-tiftix tal-medda, jew dejta eżistenti minn razez ta' annimali relatati, jindikaw li reġim tat-trattament ta' tal-inqas id-doża limitu (deskritta hawn taht) ma jipproduċi ebda effett tossiku osservabbli (inkluż ebda dipressjoni tal-proliferazzjoni tal-mudullun jew evidenza oħra ta' ċitotossiċità tat-tessut fil-mira), u jekk ma tkunx mistennija ġenotossiċità fuq il-bażi ta' studji *in vitro* tal-ġenotossiċità jew dejta minn sustanzi kimiċi relatati strutturalment, f'dak il-każ jaf ma jitqiesx neċessarju li jsir studju shih li juża tliet livelli tad-doża, diment li jkun intwera li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tilhaq it-tessut fil-mira (il-mudullun). F'dawn il-każijiet, livell tad-doża wiehed, fid-doża limitu, jista' jkun biżżejjed. Għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' > 14-il jum, id-doża limitu hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew inqas, id-doża limitu hija 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum.

Amministrazzjoni tad-doži

Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jittfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħazlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-tehid man-nifs, intratrakeali, jew b'implant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħazel sabiex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Generalment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li mhijiex rotta intiza ta' esponiment tal-bniedem, u għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew l-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wiehed, wiehed għandu joqghod attent li l-hin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u l-kampjunar ikun biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (ara l-paragrafi 33-34). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-animall tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem hliel fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw massimu ta' 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ikbar minn dan għandu jkun iġġustifikat. Hliel għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment jipproduċu effetti aggravati f'konċentrazzjonijiet ikbar, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandu jitnaqqas kemm jista' jkun billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiġi żgurata amministrazzjoni ta' volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Skeda tat-trattament

Normalment is-sustanzi kimiċi tat-test jingħataw bħala trattament wiehed, izda jistgħu jingħataw bħala doża maqsuma (jiġifieri żewġ trattamenti jew iktar fl-istess ġurnata separati b'mhux iktar minn sagħtejn jew tlieta) sabiex jiġi ffaċilitat l-ġħoti ta' volum kbir. F'dawn iċ-ċirkustanzi, jew meta s-sustanza kimika tat-test tingħata bit-tehid man-nifs, il-hin tal-kampjunar għandu jiġi skedat fuq il-bażi tal-hin tal-aħħar dożaġġ jew tmiem l-esponiment.

Ftit li xejn hemm dejta disponibbli dwar l-adeqwatezza ta' protokoll ta' doża ripetuta għal dan it-test. Madankollu, fiċ-ċirkustanzi li fihom ikun xieraq li jiġi integrat dan it-test b'test dwar it-tossiċità b'doża ripetuta, wiehed għandu joqghod attent li jevita milli jintilfu ċelloli mitotiċi bi hsara fil-kromozomi, xi haga li tista'

▼ **M7**

ssehh b'dozi tossiċi. Integrazzjoni bħal din tkun aċċettabbli meta l-ogħla doża tkun ikbar jew daqs id-doża limitu (ara l-paragrafu 29) u grupp tad-doża jingħata d-doża limitu għad-durata tal-perjodu tat-trattament. It-test tal-mikronukleu (il-metodu ta' ttestjar B.12) għandu jitqies bħala t-test in vivo tal-għażla għal aberrazzjonijiet kromozomiċi meta tkun mixtieqa integrazzjoni ma' studji oħrajn.

Għandhom jittiehdu kampjuni tal-mudullun f'zewġ hinijiet separati wara trattamenti uniċi. Għal roditori, l-ewwel intervall ta' kampjunar għandu jkun il-hin neċessarju sabiex jgħaddu darba u nofs it-tul taċ-ċiklu normali taċ-ċelloli (b'dan tal-aħħar li normalment ikun 12-18-il siegħa wara l-perjodu tat-trattament). Ladarba l-hin mehtieg għall-bidu u l-metabolizmu tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test kif ukoll l-effetti tagħha fuq il-kinetika taċ-ċikli taċ-ċelloli jistgħu jaffettwaw il-hin ottimali sabiex wiehed jintebah bl-aberrazzjoni kromozomika, huwa rakkomandat li jittiehed kampjun ieħor 24 siegħa wara li jkun ittiehed l-ewwel kampjun. Fl-ewwel hin tal-kampjunar, il-gruppi kollha tad-doża għandhom jiġu ttrattati u jingabru kampjuni għall-analizi; madankollu, fil-hin(i-jiet) tal-kampjunar iktar tard, l-ogħla doża biss trid tingħata. Jekk jintużaw reġimi tad-doži ta' iktar minn gurnata fuq il-bażi ta' ġustifikazzjoni xjentifika, generalment għandu jintuża hin tal-kampjunar wiehed sa madwar darba u nofs it-tul taċ-ċiklu normali taċ-ċelloli wara t-trattament finali.

Wara t-trattament u qabel il-ġbir tal-kampjun, l-annimali jingħataw injezzjoni intraperitoneali b'doża xierqa ta' inibitur tal-metafażi (eż. kolċemid jew kolċisina), u l-kampjuni jingabru f'intervall xieraq wara. Għall-ġrieden, dan l-intervall huwa ta' madwar 3-5 qabel il-ġbir u, għall-firien, huwa sagħtejn sa 5 sigħat. Iċ-ċelloli jingabru mill-mudullun u jitkabbru, jiġu ffissati u mlewna, u analizzati għal aberrazzjonijiet kromozomiċi (12).

Osservazzjonijiet

Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess hin(i-jiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrjn jidhru l-iktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' dożaġġ, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju, tal-inqas darba fil-ġimgha matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-fażi tal-ewtanazja. Fi studji twal tal-inqas ġimgha, il-kejl tal-konsum tal-ikel għandhom isiru tal-inqas kull ġimgha. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimgha. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (11).

Espoiniment tat-tessut fil-mira

Għandu jittiehed kampjun tad-demem f'hin(i-jiet) xieraq sabiex ikunu jistgħu jiġu mixtarra l-livelli ta' plazma tas-sustanzi kimiċi tat-test bil-ghan li jintwera li sehhiet l-esponiment tal-mudullun, meta dan ikun iġġustifikat u meta ma jkunx hemm dejta oħra dwar l-esponiment (ara l-paragrafu 44).

Preparazzjoni tal-mudullun u tal-kromozomi

Ezatt wara l-ewtanazja umanitarja, jittiehdu ċelloli tal-mudullun mill-femori jew mit-tibji tal-annimali, imbagħad dawn jiġu esposti għal soluzzjoni ipotonika u jiġu ffissati. Imbagħad iċ-ċelloli fil-metafażi jiferrxu fuq lametti u jiġu mlewning billi jintużaw metodi stabbiliti (ara (3) (12)).

▼ **M7****Analizi**

Il-lametti kollha, inklużi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti qabel l-analizi u għandhom jitqassmu b'mod aleatorju sabiex min jaqrahom ma jkunx jaf x'inhi l-kundizzjoni tat-trattament.

L-indiċi mitotiku għandu jiġi stabbilit b'hal mizura ta' ċitotossicità f'għall-inqas 1 000 ċellula għal kull annimal għal kull annimal trattat għall-annimali ttrattati (inklużi kontrolli pożittivi), mhux ittrattati jew l-annimali tal-kontroll negattiv tal-veikolu/solvent kollha.

Għandhom jiġu analizzati tal-inqas 200 metafazi għal kull annimal għal aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali, inklużi u esklużi distakki (6). Madankollu, jekk id-database storika tal-kontroll negattiv tindika li l-frekwenza medja ta' sfond ta' aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali hija $<1\%$ fil-laboratorju tal-ittestjar, għandu jiġi kkunsidrat l-ikklassifikar ta' ċelloli addizzjonali. Aberrazzjonijiet tat-tip kromatid u kromozomiku għandhom jiġu rreġistrati għalihom u jiġu kklassifikati skont is-sottotipi (ksur, skambji). Il-proċeduri li jintużaw fil-laboratorju għandhom jiżguraw li l-analizi tal-aberrazzjonijiet kromozomiċi ssir minn persuni mħarrġin sew fl-ghoti ta' punteġġi u huma evalwati bejn il-pari, jekk xieraq. Fid-dawl tal-fatt li l-proċeduri ta' preparazzjoni tal-lametti spiss jirriżultaw fil-ksur ta' sehem mill-metafazijiet li jirriżulta fit-telf ta' kromozomi, iċ-ċelloli li jingħataw punteġġ għandu jkun fihom għadd ta' ċentromeri ta' mhux inqas minn $2n+2$, fejn n hija n-numru aplojdi ta' kromozomi għal dik l-ispeċi.

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

Dejta dwar l-annimali individwali għandha tiġi pprezentata f'forma ta' tabelli. L-indiċi mitotiku, l-għadd ta' ċelloli tal-metafazi li ngħataw punteġġ, in-numru ta' aberrazzjonijiet għal kull ċellola fil-metafazi u l-perċentwal ta' ċelloli b'aberrazzjoni(jiet) kromozomika strutturali għandhom jiġu evalwati għal kull annimal. Għandhom jiġu elenkati t-tipi differenti ta' aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali bl-għadd u l-frekwenzi tagħhom għal gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Id-distakki, kif ukoll iċ-ċelloli poliplojdi u iċ-ċelloli bi kromozomi endoreduplikati għandhom jiġu rreġistrati b'mod separat. Il-frekwenza tad-distakki tiġi rrapportata iżda, ġeneralment, ma tkunx inkluża fl-analizi tal-frekwenza totali ta' aberrazzjonijiet strutturali. Jekk ma hemmx evidenza ta' differenza fir-rispons bejn is-sessi, id-dejta tista' tingħaqad f'daqqa għall-analizi statistika. Għandha tiġi rrapportata dejta dwar it-tossicità tal-annimali u s-sinjali kliniċi wkoll.

Kriterji ta' Aċċettabilità

Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabilità tat-test:

- a) Huwa aċċettat li d-dejta tal-kontroll negattiv parallel tizdied fid-database storika tal-kontroll tal-laboratorju (ara l-paragrafi 11-14);
- b) Il-kontrolli pożittivi paralleli jew il-kontrolli tal-punteġġ għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fid-database storika tal-kontrolli pożittivi u jipproduċu zieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafi 20-21);
- c) Gie analizzat in-numru xieraq ta' dozi u ċelloli;
- d) Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' dawk deskritti fil-paragrafi 25-28.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk:

▼ **M7**

- a) Tal-inqas wiehed mill-gruppi tat-trattament jesibixxi zieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali (eskluzi distakki) meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,
- b) Din iż-żieda hija marbuta mad-doża tal-inqas f'mument tal-kampjunar wiehed meta tiġi evalwata b'test tat-tendenza xieraq, u
- c) Kwalunkwe wiehed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson).

Jekk l-ogħla doża biss tiġi eżaminata f'mument tal-kampjunar partikolari, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk ikun hemm zieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel u r-riżultati jaqgħu barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson). Ir-rakkomandazzjonijiet għall-metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (13). Meta ssir analiżi tar-rispons għad-doża, għandhom jiġu analizzati tal-inqas tliet gruppi tad-doża. It-testijiet statistiċi għandhom jużaw l-annimal bħala l-unità sperimentali. Ir-riżultati pożittivi fit-test għall-aberrazzjonijiet kromożomiċi jindikaw li s-sustanza kimika tat-test tinduċi aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-mudullun tal-ispeċi ttestjata.

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali kollha eżaminati:

- a) L-ebda wiehed mill-gruppi tat-trattament ma jesibixxi zieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali (eskluzi distakki) meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,
- b) Ma hemm l-ebda zieda marbuta mad-doża fi kwalunkwe hin tal-kampjunar meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- c) Ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson), u
- d) Sehħ esponiment tal-mudullun għas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test.

Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (13). Evidenza ta' esponiment tal-mudullun għal sustanza kimika tat-test tista' tinkludi dipressjoni tal-indiċi mitotiku jew kejl tal-livelli ta' plazma jew tad-demem tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test. Fil-każ ta' amministrazzjoni fil-vina, ma hemmx bżonn ta' evidenza ta' esponiment. Inkella, tista' tintuża dejta ADME, miksuba fi studju indipendenti bl-użu tal-istess rotta u l-istess speċi, sabiex jintwera li sehħ esponiment tal-mudullun. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, fil-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza kimika tat-test ma tinduċix aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali fil-mudullun tal-ispeċi ttestjata.

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

F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar u sabiex tgħin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. zieda batuta jew limitata), id-dejta għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri tal-esperimenti eżistenti mwettqin. F'ċerti każijiet, l-analiżi ta' iktar ċelloli jew it-tweġiq ta' esperiment ripetut bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment jistgħu jkunu siewja.

▼ **M7**

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, id-dejta sejra tipprekludi konklużjoni li s-sustanza kimika tat-test tipproduċi riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, l-istudju jiġi konkluż bħala ekwivoku.

Il-frekwenzi ta' metafazijiet endoreduplikati u poliploidji fost il-metafazijiet totali għandhom jiġu rreġistrati b'mod separat. Żieda fin-numru ta' ċelloli poliploidji/endoreduplikati tista' tindika li s-sustanza kimika tat-test għandha l-potenzjal li tinibixxi l-proċessi mitotiċi jew il-progressjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli (ara l-paragrafu 3).

Rapport tat-test

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

*Sommarju**Sustanza kimika tat-test:*

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli
- l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impurità kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

- ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu.
- is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;
- il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-tehid man-nifs;
- id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż., l-istabilità, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

- l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla;
- l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-gaġeg, id-dieta, eċċ.;
- il-metodu għall-identifikazzjoni unika tal-annimali;
- għal studji fuq terminu qasir: il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn gimgha: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inkluzi.

▼ **M7***Kundizzjonijiet tat-test:*

- il-kontroll pożittiv u dak negattiv (veikolu/solvent);
- dejta minn studju għat-tiftix tal-medda, jekk ikun sar;
- ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża;
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- dettalji dwar l-ghoti tas-sustanza kimika tat-test;
- ir-raġuni għar-rotta u d-durata tal-ghoti;
- metodi għall-verifika li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test laqhet iċ-ċirkulazzjoni ġenerali jew il-mudullun;
- id-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;
- il-metodu tal-ewtanażja;
- il-metodu tal-analjeżija (meta tintuża);
- deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-għażliet;
- il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti;
- il-metodi ta' kejl tat-tossiċità;
- l-identità tal-inibitur tal-metafażi, il-konċentrazzjoni, id-doża u l-hin tal-ghoti tiegħu qabel il-kampjunar;
- il-proċeduri għall-iżolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;
- il-kriterji għall-ikklassifikar tal-aberrazzjonijiet;
- in-numru ta' ċelloli fil-metafażi analizzati għal kull animal u n-numru ta' ċelloli analizzati għad-determinazzjoni tal-indiċi mitotiku;
- il-kriterji għall-aċċettabilità tal-istudju;
- il-kriterji sabiex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew inkonklużivi.

Ir-riżultati:

- il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;
- l-indiċi mitotiku, mogħti b'mod separat għal kull animal;
- it-tip u n-numru ta' aberrazzjonijiet u ta' ċelloli aberranti, mogħti b'mod separat għal kull animal;
- in-numru totali ta' aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u d-devjazzjonijiet standard;
- in-numru ta' ċelloli b'aberrazzjonijiet għal kull grupp bil-medji u d-devjazzjonijiet standard;
- bidliet fil-ploidija, inklużi l-frekwenzi ta' ċelloli poliploidji u/jew endoreduplikati;

▼ **M7**

- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;
- l-analizijiet statistiċi u l-metodu applikat;
- dejta li ssostni l-fatt li seħħ l-esponiment tal-mudullun;
- dejta tal-kontroll negattiv parallel u tal-kontroll pożittiv bil-meded, il-medji u d-devjazzjonijiet standard;
- id-dejta storika tal-kontroll negattiv u pożittiv b'meded, medji u devjazzjonijiet standard, u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll il-perjodu ta' żmien u n-numru ta' osservazzjonijiet;
- il-kriterji ssodisfati għal rispons pożittiv jew negattiv.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konkluzjoni.

Referenzi.

TAGHRIF

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- (3) Preston, R.J. *et al.* (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, *Mutation Research*, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- (4) Richold, M. *et al.* (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (5) Tice, R.R. *et al.* (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, *Mutation Research*, Vol. 312/3, pp. 305-312.
- (6) Adler, I.D. *et al.* (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19-30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (9) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (10) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼ M7

- (11) OECD (2000), “Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.
- (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.
- (13) Lovell, D.P. *et al.* (1989), “Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Anewplojdija: Kwalunkwe devjazzjoni mill-ghadd ta' diplojdi (jew aplojdi) normali ta' kromożomi minn kromożomu wiehed jew aktar, iżda mhux minn multipli tas-sett (jew settijiet) kollu ta' kromożomi (ara poliplojdija).

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

Sustanza kimika: sustanza jew tahlita.

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

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

Endoreduplikazzjoni: Proċess li bih wara perjodu S tar-replikazzjoni tad-DNA, in-nukleu ma jidholx f'mitozi iżda jibda perjodu S iehor. Ir-riżultat huwa kromożomi b'4, 8, 16... il-kromatid.

Distakk: Leżjoni akromatika iżghar mill-wisgħa ta' kromatid wiehed, u b'misallinjament minimu tal-kromatidi.

Indiċi mitotiku: Il-proporzjon bejn in-numru ta' ċelloli f'mitozi u n-numru totali ta' ċelloli f'popolazzjoni, li huwa kejl tal-istatus tal-proliferazzjoni ta' dik il-popolazzjoni taċ-ċelloli.

Aberrazzjoni numerika: Bidla fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristku normali ta' annimali użati (anewplojdija).

Poliplojdija: Aberrazzjoni kromożomika numerika li tinvolvi bidla fin-numru tas-sett shih ta' kromożomi, għall-kuntrarju ta' bidla numerika fil-parti tas-sett ta' kromożomi (ara anewplojdija).

Aberrazzjoni kromożomika strutturali: Bidla fl-istruttura tal-kromożomi li wiehed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku tal-istadju metafaziku tad-diviżjoni taċ-ċelluoli, osservati bħala thassir u biċċiet, bidliet minn ġewwa u bidliet bejniethom.

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

▼ **M7***Appendiċi 2***ID-DISINN FATTORJALI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TAD-DIFFERENZI FIS-SESSI FL-ASSAĠĠ *IN VIVO* TAL-ABERRAZZJONI KROMOŽOMIKA****Id-disinn fattorjali u l-analiżi tiegħu**

F'dan id-disinn, jiġu ttestjati tal-inqas 5 irġiel u 5 nisa f'kull livell tal-konċentrazzjoni li jirriżultaw f'disinn li juża tal-inqas 40 annimal (20 raġel u 20 mara, flimkien ma' kontrolli pożittivi rilevanti).

Id-disinn, li huwa wiehed mill-iktar disinni fattorjali sempliċi, huwa ekwivalenti għal analiżi bidirezzjonali tal-varjanza bis-sess u l-livell ta' konċentrazzjoni li huma l-effetti ewlenin. Id-dejta tista' tiġi analizzata billi jintużaw pakketti ta' softwer statistiku standard bħal SPSS, SAS, STATA, Genstat kif ukoll bl-użu ta' R.

L-analiżi tagħmel partizzjoni tal-varjabbiltà fis-sett ta' dejta bejn is-sessi, bejn il-konċentrazzjonijiet u b'raba mal-interazzjoni bejn is-sessi u l-konċentrazzjonijiet. Kull wiehed mit-termini jiġi ttestjat kontra stima tal-varjabbiltà bejn l-annimali rreplikati fi hdan il-gruppi ta' annimali tal-istess sess bl-istess konċentrazzjoni. Id-dettalji shah dwar il-metodoloġija sottostanti huma disponibbli f'hafna kotba standard dwar l-istatistika (ara r-referenzi) u fil-faċilitajiet tal-ghajnuna pprovduti mal-pakketti statistiċi.

L-analiżi tkompli billi ssir spezzjoni tat-terminu ta' interazzjoni sess x konċentrazzjoni fit-tabella ANOVA ⁽¹⁾. Fin-nuqqas ta' terminu ta' interazzjoni sinifikanti, il-valuri kombinati bejn is-sessi jew fost il-livelli ta' konċentrazzjoni jipprovdu testijiet statistiċi validi bejn il-livelli bbażati fuq it-terminu tal-varjabbiltà tar-raggruppati fi hdan il-grupp tal-ANOVA.

L-analiżi tkompli billi tagħmel partizzjoni bejn l-istima tal-varjabbiltà bejn il-konċentrazzjonijiet f'kuntrasti li jipprovdu għal test għal kuntrasti lineari u kwadrati tar-risponsi bejn il-livelli tal-konċentrazzjonijiet. Meta jkun hemm interazzjoni sinifikanti sess x konċentrazzjoni, tista' ssir partizzjoni ta' dan it-terminu f'kuntrasti ta' interazzjoni lineari x sess u kwadrati x sess ukoll. Dawn it-termini jipprovdu testijiet ta' jekk ir-risponsi għall-konċentrazzjoni humiex paralleli għaż-żewġ sessi jew jekk hemmx rispons differenzjali bejn iż-żewġ sessi.

L-istima tal-varjabbiltà tal-miġburin fi hdan il-grupp tista' tintuża sabiex ttiprovdi testijiet bejn il-pari tad-differenza bejn il-medji. Dawn il-paraguni jistgħu jsiru bejn il-medji għaż-żewġ sessi u bejn il-medji għal-livell ta' konċentrazzjoni differenti bħal fil-każ tal-paraguni mal-livelli tal-kontroll negattiv. F'dawk il-każijiet li fihom ikun hemm interazzjoni sinifikanti, jistgħu jsiru paraguni bejn il-medji ta' konċentrazzjonijiet differenti fi hdan sess jew bejn il-medji tas-sessi fl-istess konċentrazzjoni.

Referenzi

Hemm hafna kotba dwar l-istatistika li jiddiskutu t-teorija, id-disinn, il-metodoloġija, l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-disinni fattorjali li jvarjaw mill-iktar analiżijiet b'żewġ fatturi sempliċi sal-iktar forum kumplessi użati fil-metodoloġija dwar id-Disinn tal-Esperiment. Din li ġejja mhijiex lista ezawrjenti. Uħud mill-kotba jipprovdu eżempji mahdumin ta' disinni komparabbli, f'ċerti każijiet b'ko-diċi għat-tweġiq tal-analiżijiet bl-użu ta' diversi pakketti ta' softwer.

⁽¹⁾ L-esperti tal-istatistika li jiehdu approċċ għall-immudellar bħal dak li juża Mudelli Lineari Generali (GLMs) jistgħu jagħmlu l-analiżi b'mod differenti iżda paragunabbli iżda mhux bilfors ihaddmu t-tabella anova tradizzjonali, li tmur lura għal approċċi algoritmici tal-kalkolu tal-istatistiki żviluppati qabel il-miġja tal-kompjuters.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼ **M7****B.12. TEST TAL-MIKRONUKLEU FL-ERITROĆITI MAMMIFERI****INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 474 (2016) tal-OECD Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Gie żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u harsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

It-test *in vivo* tal-mikronukleu tal-mammiferi huwa ta' rilevanza partikolari għall-valutazzjoni tal-ġenotossicità għaliex, għad li jvarja bejn l-ispeċijiet, il-fatturi tal-metaboliżmu *in vivo*, il-farmakokinetiċi u l-proċessi ta' tiswija tad-DNA huma attivi u jikkontribwixxu għar-risponsi. Assaġġ *in vivo* huwa siewi wkoll sabiex tkun tista' ssir investigazzjoni ulterjuri tal-ġenotossicità żvelata minn sistema *in vitro*.

It-test *in vivo* tal-mikronukleu tal-mammiferi jintuza għall-qbid ta' hsara indotta mis-sustanza kimika tat-test fil-kromożomi jew l-apparat mitotiku tal-eritroblasti. It-test jevalwa l-formulazzjoni tal-mikronukleu fl-eritroċiti tal-kampjun jew fil-mudullun jew fiċ-ċelloli tad-demem periferali tal-annimali, normalment roditori.

L-għan tat-test tal-mikronukleu huwa li jidentifika sustanzi kimiċi li jikkawżaw hsara ċitogenetika li tirriżulta fil-formazzjoni ta' mikronukleji li jkun fihom biċċiet ta' residwi ta' kromożomi jew kromożomi shah.

Meta eritroblast tal-mudullun jiżviluppa f'eritroċita immatura (kultant imsejha wkoll retikuloċita jew eritroċita polikromatika), in-nukleu ewlieni jiġi estruż; kwalunkwe mikronukleu li gie fformat jista' jithalla fiċ-ċitoplażma. Il-viżwalizzazzjoni jew id-detezzjoni tal-mikronukleji hija ffaċilitata f'dawn iċ-ċelloli għax ma għandhomx nukleu ewlieni. Zieda fil-frekwenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati f'annimali ttrattati hija indikazzjoni ta' aberrazzjonijiet kromożomiċi strutturali jew numeriċi indotti.

Eritroċiti mikronukleati fformati godda jiġu identifikati u kkwantifikati bit-tilwin segwit minn punteġġar viżwali bl-użu ta' mikroskopju, jew b'analizi awtomatizzata. L-għadd ta' biżżejjed eritroċiti immaturi fid-demem periferali jew fil-mudullun ta' annimali adulti huwa ffaċilitat hafna bl-użu ta' pjattaforma tal-punteġġar awtomatizzata. Dawn il-pjattaformi huma alternattivi aċċettabbli għall-evalwazzjoni manwali (2). Studji komparattivi wrew li t-tali metodi, li jużaw standards tal-kalibraġġ xierqa, jistgħu jipprovdu riproducibbiltà u sensittività ahjar bejn il-laboratorji u fi hdan il-laboratorji mill-ikklassifikar manwali bil-mikroskopju (3) (4). Sistemi awtomatizzati li jistgħu jkeġlu l-frekwenzi tal-eritroċiti mikronukleati jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, ċitometri tal-fluss (5), pjattaformi tal-analizi tal-immaġnijiet (6) (7), u ċitometri ta' skennjar bil-laser (8).

Għad li dan normalment ma jsirx bħala parti mit-test, il-frammenti tal-kromożomi jistgħu jiġu distinti minn kromożomi shah permezz ta' għadd ta' kriterji. Dawn jinkludu l-identifikazzjoni tal-preżenza jew l-assenza ta' kinetoċoru jew DNA ċentometriku, li t-tnejn li huma huma karatteristiċi ta' kromożomi intatti. L-assenza ta' kinetoċoru jew DNA ċentometriku tindika li l-mikronukleu fih biss frammenti ta' kromożomi, filwaqt li l-preżenza tindika telf ta' kromożomi.

▼ M7

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

Il-mudullun ta' rodituri adulti żgħar huwa t-tessut fil-mira għal hsara ġenetika fit-test peress li l-eritroċiti huma prodotti f'dan it-tessut. Il-kejl tal-mikronukleji f'eritroċiti immaturi fid-demmm periferali huwa aċċettabbli fi speċijiet mammiferi oħrajn li għalihom intweriet sensitività adegwata għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jikkawwaw aberrazzjonijiet kromozomiċi strutturali jew numeriċi f'dawn iċ-ċelloli (b'induzzjoni tal-mikronukleji f'eritroċiti immaturi) u għet ipprovduta ġustifikazzjoni xjentifika. Il-frekwenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati hija l-punt ta' tmiem ewlieni. Il-frekwenza tal-eritroċiti maturi li fihom mikronukleji fid-demmm periferali tista' tintuża wkoll bħala punt ta' tmiem fi speċijiet mingħajr selezzjoni splenika b'saħħitha kontra ċelloli mikronukleati u meta l-annimali jiġu ttrattati kontinwament għal perjodu li jaqbeż it-tul tal-hajja tal-eritroċita fl-ispeċijiet użati (eż. 4 gimghat jew iktar fil-ġurdien).

Jekk ikun hemm evidenza li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test, jew il-metabolit(i) tagħha, mhumix sejr in jilhq t-tessut fil-mira, jaf ma jkunx xieraq li jintuza dan it-test.

Qabel ma jintuza dan il-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.

IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

L-annimali huma esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' rotta xierqa. Jekk jintuza l-mudullun, l-annimali jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju f'hin(ijiet) xieraq wara t-ttrattament, il-mudullun jiġi estratt, u jsiru l-preparazzjonijiet u t-tilwin (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Meta jintuza demm periferali, id-demmm jingabar f'hinijiet xierqa wara t-ttrattament u jsiru l-preparazzjonijiet u t-tilwin (12) (16) (17) (18). Meta t-ttrattament jingħata b'mod akut, importanti li jingħażlu l-hinijiet tal-ġbir tal-mudullun jew tad-demmm li fihom tista' tiġi identifikata l-induzzjoni relatata mat-ttrattament ta' eritroċiti immaturi mikronukleati. Fil-każ ta' kampjunar tad-demmm periferali, irid ikun għadda wkoll biżżejjed żmien sabiex dawn l-avvenimenti jidhru fid-demmm li jiċċirkola. Il-preparati jiġu analizzati għall-preżenza ta' mikronukleji, jew b'viżwalizzazzjoni bl-użu ta' mikroskopju, analiżi tal-immaġnijiet, iċ-ċitometrija tal-fluss, jew b'ċitometrija ta' skennjar bil-laser.

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

Investigazzjonijiet tal-Profiċjenza

Sabiex jiġi stabbilit li hemm biżżejjed esperjenza fit-twettiq tal-assaġġ qabel ma jintuza għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun wera li għandu l-hila li jirriproduċi r-riżultati mistennijin mid-dejta ppubblikata (17) (19) (20) (21) (22) għall-frekwenza tal-mikronukleu b'tal-inqas żewġ sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (inkluzi risponsi dgħajfin indotti minn dozi baxxi ta' kontrolli pożittivi), bħal dawk elenkati fit-Tabella 1 u b'kontrolli tal-veikolu/solvent kompatibbli (ara l-paragrafu 26). Dawn l-esperimenti għandhom jużaw dozi li jagħtu żidiet riproducibbli u relatati mad-dozi u juru s-sensittività u l-medda dinamika tas-sistema tat-test fit-tessut ta' interess (il-mudullun jew id-demmm periferali) u jużaw il-metodu tal-punteġġ li sejjer jithaddem fil-laboratorju. Dan ir-rekwiżit mhuwix applikabbli għal laboratorji li għandhom esperjenza, jiġifieri li għandhom data-base storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 14-18.

Dejta Storika tal-Kontroll

Matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza, il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontroll pożittiv, u

▼ **M7**

— Medda u distribuzzjoni storici tal-kontroll negattiv.

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontroll ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tiżdied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni storika tal-kontroll, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni. Id-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju għandha tkun statistikament robusta sabiex tiġi żgurata l-hila tal-laboratorju sabiex jivvaluta d-distribuzzjoni tad-dejta tal-kontroll negattiv tiegħu. It-tagħrif jissuggerixxi li jista' jkun hemm bżonn ta' minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment ikun hemm tal-inqas 20 esperiment imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragonabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (23)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tagħhom, u sabiex juru li l-metodologija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom. Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inkluzjoni u l-eskluzjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (24).

Meta l-laboratorju ma jagħmilx numru kbir biżżejjed ta' esperimenti sabiex jistabbilixxi distribuzzjoni statistikament robusta tal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 15) matul l-investigazzjonijiet tal-profiċjenza (deskritti fil-paragrafu 13), jista' jiġi aċċettat li d-distribuzzjoni tinbena matul l-ewwel testijiet ta' rutina. Dan l-approċċ għandu jsegwi r-rakkomandazzjonijiet stipulati fit-tagħrif (24) u r-risultati tal-kontroll negattiv miksubin f'dawn l-esperimenti għandhom jibqgħu konsistenti mad-dejta ppubblikata tal-kontroll negattiv.

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-impatt tagħha fuq kemm id-dejta li tirriżulta tibqa' konsistenti mad-database storika eżistenti tal-kontroll tal-laboratorju. Inkonsistenzi kbar biss għandhom jirriżultaw fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll, fejn il-ġudizzju tal-esperti jistabbilixxi li tvarja mid-distribuzzjoni ta' qabel (ara l-paragrafu 15). Matul l-istabbiliment mill-ġdid, jaf ma jkunx hemm bżonn ta' database shiha tal-kontroll negattiv sabiex ikun jista' jsir test propju, diment li l-laboratorju jkun jista' juri li l-valuri tal-kontroll negattiv parallel tiegħu jibqgħu konsistenti mad-database ta' qabel jew mad-dejta ppubblikata korrispondenti.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza eritroċiti immaturi mikronukleati f'kull annimal. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju. Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel toħroġ mill-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħhal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun "taħt kontroll" (ara l-paragrafu 15) u ebda evidenza ta' żball tekniku jew uman.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparamenti

Għażla ta' speċi tal-annimali

Għandhom jintużaw razez użati spiss fil-laboratorju ta' annimali żgħar b'saħ-hithom. Jistgħu jintużaw ġrieden, firien jew speċijiet mammiferi xierqa oħrajn. Meta jintuża demm periferali, irid jiġi stabbilit li t-tnehhija splenika ta' celloli

▼ M7

mikronukleati miċ-ċirkulazzjoni ma tqeghidx friskju d-detezzjoni ta' mikronukleji indotti fl-ispeċi magħżula. Dan intwera biċ-ċar għad-demem periferali tal-ġrieden u l-firien (2). Fir-rapport għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika meta jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex firien u ġrieden. Jekk jintużaw speċijiet oħrajn li mhumiex roditori, huwa rakkomandat li l-kejl tal-mikronukleji indotti jiġi integrat f'test xieraq ieħor tat-tossiċità.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

Għar-roditori, it-temperatura fil-kamra tal-annimali għandha tkun ta' 22 °C ($\pm$ 3 °C). Għad li, idealment, l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, għandha tkun tal-inqas 40 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % hlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dietta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata tahlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-roditori għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (mhux iktar minn hamsa f'gagġa) tal-istess sess u grupp tat-trattament jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva, idealment f'gagġi solidi mal-art bl-arrikkiment ambjentali xieraq. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom biss jekk dan ikollu ġustifikazzjoni xjentifika.

Preparazzjoni tal-annimali

Normalment jintużaw annimali adulti żgħar b'saħħithom (għal roditori, idealment 6-10 ġimgħat fil-bidu tat-trattament, għad li jistgħu jiġu aċċettati annimali ftit ixjaħ ukoll), u dawn jiġu assenjati b'mod aleatorju għall-gruppi tal-kontroll u tat-trattament. L-annimali individwali jiġu identifikati b'mod uniku bl-użu ta' metodu umanitarju u l-inqas invasiv possibbli (eż. b'ċirku madwarhom, tikketti, mikro-ċipep jew identifikazzjoni bijometrika, iżda mhux b'titqib fil-widnejn jew fis-swaba') u jithallaw iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas hamest ijiem. Il-gagġi għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minhabba t-tqeghid tal-gagġi. Għandha tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata mill-kontroll pożittiv u s-sustanza kimika tat-test. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx $\pm$ 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-dożi

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinhallu jew jiġu sospizi f'solventi jew veikoli xierqa jew jithalltu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-tehid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bhala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fizikokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparati ġodda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

Kundizzjonijiet tat-test

Solvent/veikolu

Is-solvent/veikolu ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli tad-doża użati, u ma għandux ikun kapaċi li johloq reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inkluzjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Eżempji ta' solventi/veikoli kompatibbli użati spiss jinkludu ilma, salina fiżjoloġika, soluzzjoni tal-metilċelluloża, soluzzjoni tal-melħ tas-sodju taċ-ċelluloża tal-karbossimetilċelluloża, żejt taż-żebuga u żejt tal-qamħirrum. Fin-nuqqas ta' dejta storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huma indotti ebda mikronukleu u effett dannuż ieħor minn solvent/veikolu atipiku magħżul, għandu jsir studju inizjali sabiex tiġi stabbilita l-aċċettabilità tal-kontroll tas-solvent/veikolu.

▼ **M7****Kontrolli***Kontrolli pożittivi*

Normalment għandu jkun inkluż grupp ta' annimali ttrattati b'sustanza kimika tal-kontroll pożittiv ma' kull test. Dan jista' jiġi rrinunzjat meta l-laboratorju tal-ittestjar ikollu profiċjenza murija fit-twettiq tat-test u jkun stabbilixxa medda storika tal-kontroll pożittiv. Meta ma jkunx hemm grupp tal-kontroll pożittiv parallel inkluż, il-kontrolli tal-punteġġ (lametti fissi u mhux imlewnin jew kampjuni ta' sospensjoni taċ-ċelloli, kif ikun xieraq għall-metodu tal-punteġġar) għandhom ikunu inkluzi f'kull esperiment. Dawn jistgħu jinkisbu billi fil-punteġġar tal-istudju jiddaħhlu kampjuni ta' referenza xierqa li nkisbu u nħażnu minn esperiment tal-kontroll pożittiv separat imwettaq b'mod perijodiku (eż. kull 6-18-il xahar); pereżempju, matul l-ittestjar tal-profiċjenza u fuq bażi regolari wara, fejn ikun hemm bżonn.

Is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom jipproduċu b'mod affidabbli zieda identifikabbli fil-frekwenza tal-mikronukleji fuq il-livell spontanju. Meta ssir klassifikazzjoni manwali bil-mikroskopju, id-dożi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħaḥu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tal-kampjuni kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettabbli li l-kontroll pożittiv jingħata b'rotta differenti mis-sustanza kimika tat-test, bl-użu ta' skeda tat-trattament differenti, u li l-kampjunar isehh biss f'waqt partikolari biss. Barra minn dan, jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv relatati mal-klassi tas-sustanzi kimiċi, meta xieraq. Fit-Tabella 1 hemm inkluzi eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv.

*Tabella 1***Eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv.**

Sustanzi Kimiċi u CASRN
Metansulfonat tal-etil [CASRN 62-50-0]
Metansulfonat tal-metil [CASRN 66-27-3]
Nitrosurea tal-etil [CASRN 759-73-9]
Mitomicina C [CASRN 50-07-7]
Ċiklofosfamida (monoidrat) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Trietilenmelamina [CASRN 51-18-3]
Kolċisina [CASRN 64-86-8] jew Vinblastina [CASRN 865-21-4] — bħal anew- ġeni

Kontrolli negattivi

L-annimali tal-grupp tal-kontroll negattiv għandhom ikunu inkluzi f'kull hin tal-kampjunar u l-bqija jiġu mmanigġjati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, hlief li ma jirċivux trattament bis-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent/-veikolu fl-ghoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi dan is-solvent/il-veikolu. Madankollu, jekk jintwera li hemm varjabbiltà konsistenti bejn l-annimali u frekwenzi ta' ċelloli b'mikronukleji permezz ta' dejta storika tal-kontroll negattiv f'kull waqt tal-kampjunar għal-laboratorju tal-ittestjar, jaf ikun hemm bżonn ta' kampjunar wiehed biss għall-kontroll negattiv. Meta jintuża kampjunar wiehed għall-kontrolli negattivi, għandu jkun l-ewwel waqt tal-kampjunar użat fl-istudju.

▼ **M7**

Jekk jintuża demm periferali, kampjun ta' qabel it-trattament jista' jigi aċċettat minflok kontroll negattiv parallel għal studji fuq terminu qasir meta d-dejta li tirriżulta tkun konsistenti mad-database storika tal-kontroll għal-laboratorju tal-ittejtjar. Intwera li għall-firien, il-kampjunar ta' volumi żgħar (eż. taħt il-100 µl/jum) qabel it-trattament għandu impatt minimu fuq il-frekwenza tal-isfond tal-mikronukleji (25).

PROCEDURA**In-numru u s-sess tal-annimali**

B'mod ġenerali, ir-rispons tal-mikronukleu huwa simili bejn l-annimali rġiel u, għalhekk, hafna mill-istudji jistghu jsiru f'kull sess (26). Dejta li turi d-differenzi rilevanti bejn l-irġiel u n-nisa (eż. differenzi fit-tossicità sistemika, il-metabolizmu, il-bijodisponibilità, it-tossicità tal-mudullun, eċċ. inkluż, eż. fi studju għat-tiftix tal-medda) thegħeġ l-użu taż-żewġ sessi. F'dan il-każ, jaf ikun xieraq li jsir studju fiz-żewġ sessi, eż. bhala parti minn studju ripetut tat-tossicità tad-doża. Jaf ikun xieraq li jintuża d-disinn fattorjali f'każ li jintużaw iż-żewġ sessi. Dettalji dwar kif tiġi analizzata d-dejta bl-użu ta' dan id-disinn huma mogħtijin fl-Appendiċi 2.

Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju għandhom jiġu stabbiliti bil-għan li jiġu pprovduti tal-inqas 5 annimali analizzabbli ta' sess wiehed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn, għal kull grupp. Fejn l-esponiment uman għas-sustanzi kimiċi jista' jkun speċifiku għas-sess, bhal ma jsehh pereżempju għal ċerti prodotti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq. Bhala gwida għal rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju fil-mudullun imwettaq skont il-parametri stabbiliti fil-paragrafu 37 bi tliet gruppi tad-doża u kontrolli negattivi u pożittivi paralleli (kull grupp imsawwar minn hames annimali ta' sess uniku), ikun jehtieġ bejn 25 u 35 annimal.

Livelli tad-doża

Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda dejta xierqa diġà disponibbli sabiex tghin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jrid jintuża fl-istudju ewlieni (27). L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bhala l-ogħla doża li sejra tiġi tollerata mingħajr evidenza ta' tossicità li tillimita l-istudju, b'rabta mad-durata tal-perjodu tal-istudju (pereżempju, billi tiġi indotta dipressjoni tal-piż tal-ġisem jew ċitotossicità tas-sistema ematopoetika, iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigh, tbatija jew diffikultà li jehtieġu ewtanażja umanitarja (28)).

L-ogħla doża tista' tiġi identifikata wkoll bhala doża li tipproduċi tossicità fil-mudullun (eż. tnaqqis fil-proporzjon ta' eritrociti immaturi fost l-eritrociti totali fil-mudullun jew id-demm periferali ta' iktar minn 50 %, iżda mhux għal inqas minn 20 % tal-valur tal-kontroll). Madankollu, meta jiġu analizzati ċ-ċelloli pożittivi għas-CD71 fiċ-ċirkulazzjoni tad-demm periferali (jiġifieri biċ-ċitometrija tal-fluss), din il-frazzjoni bikrija hafna ta' eritrociti immaturi twieġeb għall-isfidi tossiċi iktar malajr mill-koorti ikbar pożittivi għall-RNA ta' eritrociti immaturi. Għaldaqstant, it-tossicità ikbar tista' ssir evidenti f'disinni tal-esponiment akut li jeżaminaw il-frazzjoni ta' eritrociti immaturi pożittivi għas-CD71 meta mqabbla ma' dawh li jidentifikaw eritrociti immaturi fuq il-bażi tal-kontenut tal-RNA. Għal din ir-raġuni, meta l-esperimenti jużaw hamest ijiem tat-trattament jew inqas, l-ogħla livell tad-doża għas-sustanzi kimiċi tat-test li jikkaġunaw tossicità jista' jigi definit bhala d-doża li tikkaġuna tnaqqis statistikament sinifikanti fil-proporzjon ta' eritrociti immaturi pożittivi għas-D71 fost l-eritrociti totali iżda mhux inqas minn 5 % tal-valur tal-kontroll (29).

▼ **M7**

Sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni tal-proprietajiet tossikokinetiċi, jew jinduċu proċessi ta' ditossifikazzjoni li jistgħu jwasslu għal tnaqqis fl-esponiment wara għoti fit-tul jistgħu jkun eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' ssett tad-dożi u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

Sabiex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju shih għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv u tal-inqas tliet livelli ta' dożi ġeneralment separati b'fattur ta' 2, iżda mhux ikbar minn 4. Jekk is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċi tossiċità fi studju għat-tiftix tal-medda jew fuq il-bażi tad-dejta eżistenti, l-ogħla doża għal perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew iktar għandha tkun ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum, jew għal perjodi ta' amministrazzjoni ta' inqas minn 14-il jum, 2 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaguna tossiċità, l-MTD għandha tkun l-ogħla doża mogħtija u l-livelli tad-doża użati idealment għandhom ikopru medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossiċità jew ebda tossiċità. Meta tiġi osservata tossiċità tat-tessut fil-mira (il-mudullun) fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, huwa rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'dożi mhux tossiċi. Studji li jkollhom l-għan li jikkarakterizzaw iktar bis-shih l-informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża jistgħu jeħtieġu gruppi tad-doża addizzjonali. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn rekwiżiti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw.

Test tal-limitu

Jekk l-esperimenti għat-tiftix tal-medda, jew dejta eżistenti minn razez ta' annimali relatati, jindikaw li reġim tat-trattament ta' tal-inqas id-doża limitu (deskritta hawn taht) ma jipproduċi ebda effett tossiku osservabbli (inkluż ebda dipressjoni tal-proliferazzjoni tal-mudullun jew evidenza oħra ta' ċitotossicità tat-tessut fil-mira), u jekk ma tkunx mistennija ġenotossicità fuq il-bażi ta' studji *in vitro* tal-ġenotossicità jew dejta minn sustanzi kimiċi relatati strutturalment, f'dak il-każ jaf ma jitqiesx neċessarju li jsir studju shih li juża tliet livelli tad-doża, diment li jkun intwera li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tilhaq it-tessut fil-mira (il-mudullun). F'dawn il-każijiet, livell tad-doża wieħed, fid-doża limitu, jista' jkun biżżejjed. Meta l-ghoti jsir għal 14-il jum jew iktar, id-doża limitu hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi ta' għoti ta' 14-il jum jew inqas, id-doża limitu hija ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum.

Amministrazzjoni tad-dożi

Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħazlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-tehid man-nifs, intratrakeali, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħazel sabiex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Ġeneralment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li mhijiex rotta intiża ta' esponiment tal-bniedem, u għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi mħallta fid-dieta jew l-ilma tax-xorb, speċjalment fil-każ ta' dożaġġ wieħed, wieħed għandu joqgħod attent li l-hin bejn il-konsum tal-ikel u l-ilma u l-kampjunar ikun biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati l-effetti (ara l-paragrafi 37). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Normalment il-volum ma għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem hliel fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jistgħu jintużaw massimu ta' 2 ml/100 g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ikbar minn dan għandu jkun iġġustifikat. Hliel għal sustanzi kimiċi tat-test irritanti jew korrużivi, li normalment jipproduċu effetti aggravati f'koncentrazzjonijiet ikbar, il-varjabilità fil-volum tat-test għandu jitnaqqas kemm jista' jkun billi tiġi aġġustata l-koncentrazzjoni sabiex tiġi żgurata amministrazzjoni ta' volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

▼ M7

Skeda tat-trattament

Idealment, isiru 2 trattamenti jew iktar, moghtijin f'intervalli ta' 24 siegħa, speċjalment meta dan it-test jiġi integrat fi studji oħrajn dwar it-tossicità. Inkella, jistgħu jingħataw trattamenti wahedhom, jekk ikunu ġġustifikati xjentifikament (eż. sustanzi kimiċi tat-test li jkunu magħrufin li jimblokkaw iċ-ċiklu taċ-ċelloli). Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw ukoll bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattamenti jew iktar fl-istess ġurnata separati b'mhux iktar minn sagħtejn jew tlieta) sabiex jiġi ffaċilitat l-ghoti ta' volum kbir. F'dawn iċ-ċirkustanzi, jew meta s-sustanza kimika tat-test tingħata bit-tehid man-nifs, il-hin tal-kampjunar għandu jiġi skedat fuq il-bażi tal-hin tal-aħħar dożaġġ jew tmiem l-esponiment.

It-test jista' jsir fi grieden jew firien b'wiehed minn dawn it-tliet modi:

- a. L-annimali jiġu ttrattati bis-sustanza kimika tat-test darba. Il-kampjuni tal-mudullun jittiehdu tal-inqas darbtejn (minn gruppi indipendenti ta' annimali), l-ewwel wiehed mhux qabel 24 siegħa wara t-trattament, iżda mhux wara 48 siegħa wara t-trattament b'intervall(i) xieraq bejn il-kampjuni, sakemm sustanza kimika tat-test ma tkunx magħrufa li għandha nofs haġja partikolarment twila. L-uzu ta' hinijiet tat-tehid ta' kampjuni qabel 24 siegħa wara t-trattament għandu jkun iġġustifikat. Il-kampjuni ta' demm periferali jittiehdu għall-inqas darbtejn (mill-istess grupp ta' annimali), l-ewwel wiehed mhux qabel 36 siegħa wara t-trattament, b'intervall(i) xierqa wara t-tehid ta' l-ewwel kampjun, iżda mhux aktar minn 72 siegħa. Fl-ewwel hin tal-kampjunar, il-gruppi kollha tad-doża għandhom jiġu ttrattati u jingabru kampjuni għall-analiżi; madankollu, fil-hin(ijiet) tal-kampjunar iktar tard, l-oghla doża biss trid tingħata. Meta jiġi identifikat rispons pożittiv f'hin tal-kampjun wiehed, ma jkunx hemm bżonn li jittiehdu iktar kampjuni sakemm ma jkunx hemm bżonn ta' informazzjoni kwantitattiva dwar ir-rispons għad-doża. Il-hinijiet tal-ġbir deskritti huma konsegwenza tal-kinetika tal-feġġa u l-ghibien tal-mikronukleji f'dawn iż-2 kompartimenti tat-tessut.
- b. Jekk jintużaw 2 trattamenti kuljum (eż. żewġ trattamenti f'intervalli ta' 24 siegħa), għandhom jingabru kampjuni darba bejn 18 u 24 siegħa wara l-aħħar trattament riward il-mudullun jew darba bejn 36 u 48 siegħa wara l-aħħar trattament rigward demm periferali (30). Il-hinijiet tal-ġbir deskritti huma konsegwenza tal-kinetika tal-feġġa u l-ghibien tal-mikronukleji f'dawn iż-2 kompartimenti tat-tessut.
- c. Jekk jintużaw tliet trattamenti kuljum jew iktar (eż. tliet trattamenti jew iktar f'intervalli ta' madwar 24 siegħa), il-kampjuni tal-mudullun għandhom jingabru mhux iktar minn 24 siegħa wara l-aħħar trattament u d-demm periferali għandu jingabar mhux iktar tard minn 40 siegħa wara l-aħħar trattament (31). Din il-possibbiltà ta' trattament thaddem tahlita tal-assaġġ kometa (eż. kampjunar 2-6 sigħat mill-aħħar trattament) mat-test tal-mikronukleji, u l-integrazzjoni tat-test tal-mikronukleji ma' studji tat-tossicità b'doża ripetuta. Id-dejta akkumulata tissuggerixxi li l-induzzjoni tal-mikronukleji tista' tiġi osservata matul dawn il-perjodi itwal ta' żmien meta jingħataw 3 doži jew iktar (15).

Jistgħu jintużaw reġimi oħrajn tad-dożaġġ jew tal-kampjunar meta dawn ikunu rilevanti u xjentifikament iġġustifikati, u sabiex tiġi ffaċilitata l-integrazzjoni ma' testijiet oħrajn tat-tossicità.

Osservazzjonijiet

Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali fuq l-annimali tat-test u s-sinjali kliniċi għandhom jiġu rreġistrati tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess hin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejrjn jidhru l-iktar l-effetti antiċipati. Tal-inqas darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' dożaġġ, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu fil-bidu tal-istudju, tal-inqas darba fil-gimgha matul l-istudji b'doża ripetuta, u fil-fażi tal-ewtanazja. Fi studji twal

▼ M7

tal-inqas ġimġha, il-kejljet tal-konsum tal-ikel għandhom isiru tal-inqas kull ġimġha. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimġha. L-animali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanazzati b'mod umanitarju qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (28). F'ċerti ċirkustanzi, it-temperatura tal-ġisem tal-animali tista' tiġi ssorveljata, peress li ipertermja u ipotermja indotti mit-trattament ġew implikati fil-produzzjoni ta' riżultati spurġi (32) (33) (34).

Espaniment tat-tessut fil-mira

Għandu jittiehed kampjun tad-demem f'hin(ijiet) xieraq sabiex ikunu jistgħu jiġu mixtarra l-livelli ta' plazma tas-sustanzi kimiċi tat-test bil-għan li jintwera li sehhiet l-espaniment tal-mudullun, meta dan ikun iġġustifikat u meta ma jkunx hemm dejta oħra dwar l-espaniment (ara l-paragrafu 48).

Preparazzjoni tal-mudullun / tad-demem

Normalment iċ-ċelloli tal-mudullun jinkisbu mill-femori jew mit-tibji tal-animali, eżatt wara l-ewtanazja umanitarja. Spiss, iċ-ċelloli jitnehhew, jittejjew u jitlewnu bl-użu tal-metodi stabbiliti. Jistgħu jinkisbu volumi żgħir ta' demm periferali, skont l-istandards adegwati dwar it-trattament xieraq tal-animali, jew bl-użu ta' metodu li jippermetti li l-animali tat-test jibqa' haġ, bħall-fsad mill-vina tad-denb jew vina xierqa oħra, jew b'titqiba kardijaka jew kampjunar minn vina kbira fil-faġi tal-ewtanazja tal-animali. Kemm għal eritroċiti miksubin mill-mudullun kif ukoll dawk mid-demem periferali, skont il-metodu ta' analiżi, iċ-ċelloli jista' jsir ilhom tilwin sopravitali minnufih (16) (17) (18), isiru l-preparazzjonijiet tal-istrixxi li mbagħad jitlewnu għall-mikroskopju, jew inkella jiġu ffixsati u jitlewnu kif xieraq għall-analiżi biċ-ċitometrija tal-fluss. L-użu ta' tilwin speċifiku tad-DNA [eż. orangjo tal-akridina (35) jew Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)] jista' jelimina xi wħud mill-artifatti assoċjati mal-użu ta' tilwin mhux speċifiku għad-DNA. Dan il-vantaġġ ma jipprekludix l-użu ta' tilwin konvenzjonali (eż. Giemsa għall-analiżi bil-mikroskopju). Jistgħu jintużaw ukoll sistemi addizzjonali [eż. kolonni taċ-ċelluloża li jneħħu ċelloli nukleati (37) (38)] diment li jkun intwera li dawn is-sistemi huma kompatibbli mal-preparazzjoni tal-kampjun fil-laboratorju.

Meta dawn il-metodi jkunu applikabbli, jistgħu jintużaw antikorpi antikinetotroċi (39), FISH b'sondi tad-DNA panċentromeriċi (40) jew tikkettar *in situ* mogħti primer bi primers speċifiċi għall-panċentromeri, flimkien mal-kontrolltilwin xieraq tad-DNA (41), sabiex tiġi identifikata n-natura tal-mikronukleji (kromożoma/-framment kromożomika) sabiex jiġi stabbilit jekk il-mekkanizmu tal-induzzjoni tal-mikronukleu huwiex dovut għal attività klastoġenika u/jew aneġenika. Jistgħu jintużaw metodi oħrajn għal divrenzjar bejn il-klastoġeni u l-aneġeni jekk ikun intwera li dawn huma effettivi.

Analiżi (manwali u awtomatizzata)

Il-lametti jew il-kampjuni għall-analiżi kollha, inkluzi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti qabel kull xorta ta' analiżi u għandhom jitqassmu b'mod aleatorju sabiex min jaqrahom manwalment ma jkunx jaf x'inhil-kundizzjoni tat-trattament; it-tali kodifikazzjoni mhijiex neċessarja meta jintużaw sistemi ta' klassifikazzjoni awtomatizzati li ma jehtigux spezzjoni viżwali u li ma jistgħux jiġu affettwati minn preġudizzju tal-operatur. Il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali (immaturi + maturi) tiġi stabbilita għal kull annimal billi jingħaddu għall-inqas 500 eritroċiti għall-mudullun u 2 000 eritroċiti għad-demem periferali (42). Għandu jingħata punteġġ lil mill-inqas 4 000 eritroċiti immaturi għall-inċidenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati (43). Jekk id-database storika tal-kontroll negattiv tindika li l-frekwenza medja ta' sfond ta' eritroċiti immaturi mikronukleati hija ta' < 0.1 % fil-laboratorju tal-ittestjar, għandu jiġi kkunsidrat l-ghoti ta' punteġġ lil ċelloli addizzjonali. Meta jiġu analizzati l-kampjuni, il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi

▼ **M7**

għall-eritroċiti totali fl-annimali tat-trattament ma għandux ikun inqas minn 20 % tal-proporzjon tal-kontroll tal-veikolu/solvent meta l-punteġġar isir bil-mikroskopju u mhux inqas minn madwar 5 % tal-proporzjon tal-kontroll tal-veikolu/solvent meta l-punteġġar tal-eritroċiti immaturi tas-CD71+ isir b'metodi ċitometriċi (ara l-paragrafu 31) (29). Pereżempju, għal assaġġ tal-mudullun mogħti punteġġ bil-mikroskopju, jekk il-proporzjon tal-kontroll tal-eritroċiti immaturi fil-mudullun ikun ta' 50 %, il-limitu superjuri tat-tossiċità jkun 10 % eritroċiti immaturi.

Peress li l-milsa tal-firien taħtaf u teqred l-eritroċiti mikronukleati, sabiex tinzamm sensittività għolja tal-assaġġ meta jiġi analizzat id-demmi periferali tal-firien, idealment l-analizi tal-eritroċiti immaturi mikronukleati tiġi ristretta għall-iżgħar frazzjoni. Meta jintużaw metodi tal-analizi awtomatizzati, dawn l-iktar eritroċiti immaturi jistgħu jiġu identifikati fuq il-bażi tal-kontenut għoli ta' RNA tagħhom, jew il-livell għoli ta' riċetturi tat-transferrina (CD71+) espress fuq il-wiċċ tagħhom (31). Madankollu, paragun dirett tal-metodi ta' tilwin differenti wera li jistgħu jinkisbu riżultati sodisfaċenti b'bosta metodi, inkluż it-tilwin konvenzjonali bl-oranġjo tal-akridina (3) (4).

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

Dejta dwar l-annimali individwali għandha tiġi ppreżentata f'forma ta' tabelli. Għal kull annimal li jiġi analizzat għandhom jiġu elenkati separatament in-numru ta' eritroċiti immaturi li jingħaddu, il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi mikronukleati, u n-numru ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali. Meta l-ġrieden jiġu ttrattati kontinwament għal 4 ġimgħat jew iktar, id-dejta dwar in-numru u l-proporzjon ta' eritroċiti maturi mikronukleati għandha tingħata wkoll jekk tingabar. Għandha tiġi rrapportata dejta dwar it-tossiċità tal-annimali u s-sinjali kliniċi wkoll.

Kriterji ta' Aċċettabilità

Il-kriterji li ġejjin jistabbilixxu l-aċċettabilità tat-test:

- Huwa aċċettat li d-dejta tal-kontroll negattiv parallel tizdied fid-database storika tal-kontroll tal-laboratorju (ara l-paragrafi 15-18).
- Il-kontrolli pożittivi paralleli jew il-kontrolli tal-punteġġ għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' daww iġġenerati fid-database storika tal-kontroll pożittiv u jipproduċu zieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv parallel (ara l-paragrafi 24-25).
- Ġie analizzat in-numru xieraq ta' dozi u ċelloli;
- Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' daww deskritti fil-paragrafi 30-33.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk:

- Tal-inqas wiehed mill-gruppi tat-trattament jesibixxi zieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza eritroċiti immaturi mikronukleati meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,
- Din iż-żieda hija marbuta mad-doża tal-inqas f'mument tal-kampjunar wiehed meta tiġi evalwata b'test tat-tendenza xieraq, u
- Kwalunkwe wiehed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbazati fuq Poisson).

▼M7

Jekk l-ogħla doża biss tiġi eżaminata f'mument tal-kampjunar partikolari, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk ikun hemm żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel u r-rizultati jaqgħu barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson). Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (44) (45) (46) (47). Meta ssir analiżi tar-rispons għad-doża, għandhom jiġu analizzati tal-inqas tliet gruppi tad-doża. It-testijiet statistiċi għandhom jużaw l-annimal bħala l-unità sperimentali. Ir-rizultati pożittivi minn test mikronukleu jindikaw li sustanza kimika tat-test tinduċi mikronukleji li huma r-rizultat ta' ħsara fil-kromożomi jew ħsara fl-apparat mitotiku fl-eritroblasti tal-ispeċi tat-test. F'każ li fih ikun sar test sabiex jinqabdu ċentromeri fi hdan mikronukleji, sustanza kimika tat-test li tipproduċi mikronukleji li fihom ċentromeri (DNA ċentromeriku jew kinetoċoru, li jindika telf ta' kromożoma shiha) hija evidenza li s-sustanza kimika tat-test hija anewġen.

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali kollha eżaminati:

- a. L-ebda wieħed mill-gruppi tat-trattament ma jesibixxi żieda statistikament sinifikanti fil-frekwenza eritroċiti immaturi mikronukleati meta mqabbel mal-kontroll negattiv parallel,
- b. Ma hemm l-ebda żieda marbuta mad-doża fi kwalunkwe hin tal-kampjunar meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- c. Ir-rizultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson), u
- d. Sehh esponiment tal-mudullun għas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test.

Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (44) (45) (46) (47). Evidenza ta' esponiment tal-mudullun għal sustanza kimika tat-test tista' tinkludi dipressjoni tal-proporzjon ta' eritroċiti immaturi għal maturi jew kejl tal-livelli ta' plażma jew tad-demem tas-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test. Fil-każ ta' għoti fil-vina, ma hemmx b'żonn ta' evidenza tal-esponiment. Inkella, tista' tintuża dejta ADME, miksuba fi studju indipendenti bl-użu tal-istess rotta u l-istess speċi, sabiex jintwera li sehh esponiment tal-mudullun. Ir-rizultati negattivi jindikaw li, fil-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza kimika tat-test ma tipproduċi mikronukleji fl-eritroċiti immaturi tal-ispeċi tat-test.

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

F'każijiet li fihom ir-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar u sabiex tghin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat (eż. żieda batuta jew limitata), id-dejta għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri tal-esperimenti eżistenti mwettqin. F'ċerti każijiet, l-analiżi ta' iktar ċelloli jew it-tweġiq ta' esperiment ripetut bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment jistgħu jkunu siewja.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, id-dejta sejra tipprekludi konklużjoni li s-sustanza kimika tat-test tipproduċi riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, l-istudju jiġi konkluż bħala ekwivoku.

Rapport tat-test

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

Sommarju

Sustanza kimika tat-test:

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

▼ **M7**

- l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impurità kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet:

- ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test:

- il-ġustifikazzjoni għall-ghażla tal-veikolu.
- is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;
- il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-tehid man-nifs;
- id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż. l-istabilità, l-omoġenità, il-konċentrazzjonijiet nominali), meta jsiru.

L-annimali tat-test:

- l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-ghażla;
- l-ghadd, l-età u s-sess tal-annimali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-ġaġeg, id-dieta, eċċ.;
- il-metodu għall-identifikazzjoni unika tal-annimali;
- studji fuq terminu qasir: il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test; għal studji itwal minn ġimgħa: il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju u l-konsum ta' ikel. Il-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp għandhom ikunu inklużi.

Kundizzjonijiet tat-test:

- dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv (veikolu/solvent);
- dejta minn studju għat-tiftix tal-medda, jekk ikun sar;
- ir-raġuni għall-ghażla tal-livell tad-doża;
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- dettalji dwar l-ghoti tas-sustanza kimika tat-test;
- ir-raġuni għar-rotta u d-durata tal-ghoti;
- metodi għall-verifika li s-sustanza (jew sustanzi) kimika tat-test laqgħet iċ-ċirkulazzjoni ġenerali jew it-tessut fil-mira;

▼ **M7**

- id-doża propja (mg/kg piż tal-gisem/jum) ikkalkolata mill-konċentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma;
- il-metodu tal-ewtanazja;
- il-metodu tal-analgeżija (meta tintuża);
- deskrizzjoni dettaljata tat-trattament u l-iskedi tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall- għażliet;
- il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti;
- il-proċeduri għall-izolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;
- il-metodi ta' kejl tat-tossiċità;
- kriterji għall-ikklassifikar tal-eritroċiti immaturi mikronukleati;
- in-numru ta' ċelloli analizzati għal kull animal fid-determinazzjoni tal-frekwenza ta' eritroċiti immaturi mikronukleati u għad-determinazzjoni tal-proporzjon ta' eritroċiti immaturi għal maturi;
- il-kriterji għall-aċċettabilità tal-istudju;
- il-metodi, bħall-użu ta' antikorpi antikinetoċori jew sondi tad-DNA speċifiċi għaċ-ċentromeri, sabiex jiġi kkaratterizat jekk mikronukleu fiha kromozomi shah jew frammentati, jekk applikabbli.

Ir-riżultati:

- il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità;
- il-proporzjon ta' eritroċiti immaturi fost l-eritroċiti totali;
- in-numru ta' eritroċiti immaturi mikronukleati, mogħti separatament għal kull animal;
- id-devjazzjoni standard medja $\pm$ ta' eritroċiti immaturi mikronukleati għal kull grupp;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli;
- l-analiżijiet statistiċi u l-metodi applikati;
- dejta tal-kontroll negattiv u tal-kontroll pożittiv paralleli bil-meded, il-medji u d-devjazzjonijiet standard;
- id-dejta storika tal-kontroll negattiv u pożittiv b'meded, medji u devjazzjonijiet standard, u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll il-perjodu ta' żmien u n-numru ta' punti ta' dejta;
- dejta li ssostni l-fatt li seħh l-esponiment tal-mudullun;
- dejta ta' karatterizzazzjoni li tindika jekk mikronukleu fiha kromozomi shah jew frammentati, jekk applikabbli;
- il-kriterji ssodisfati għal rispons pożittiv jew negattiv.

▼ **M7**

Diskussjoni tar-riżultati.

Konkluzjoni.

Referenzi.

TAGHRIF

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Hayashi, M. *et al.* (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. *et al.* (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. *et al.* (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.
- (7) Asano, N. *et al.* (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitaly stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.
- (8) Styles, J.A. *et al.* (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. *et al.* (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. *et al.* (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. *et al.* (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼ **M7**

- (14) MacGregor, J.T. *et al.* (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. *et al.* (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.
- (16) Hayashi, M. *et al.* (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.
- (21) Hayes, J. *et al.* (2009), The rat bone marrow micronucleus test—study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.
- (22) Wakata, A. *et al.* (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (24) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (25) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-120.
- (26) Hayashi, M. *et al.* (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (27) Fielder, R.J. *et al.* (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼ M7

- (28) OECD (2000), “Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. *et al.* (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313-319.
- (31) Hayashi, M. *et al.* (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. *et al.* (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411-415.
- (40) Miller, B.M. *et al.* (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.
- (43) OECD (2014), “Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼ M7

- (44) Richold, M. *et al.* (1990), “In Vivo Cytogenetics Assays”, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (45) Lovell, D.P. *et al.* (1989), “Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
- (46) Hayashi, M. *et al.* (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.
- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

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

Sustanza kimika: sustanza jew tahlita.

Eritroblast: Stadju bikri fl-iżvilupp tal-eritroċita, li jiġi ezatt qabel l-eritroċita immatura, fejn iċ-ċellola jkun għad fiha nukleu.

Kinetoċoru: L-istruttura tal-proteini li tiffirma fiċ-ċentromeru taċ-ċelloli ewkarjotiċi, li torbot il-kromożoma mal-polimeri mikrotubuli mill-magħżel mitotiku matul il-mitozi u mejozi u l-funzjonijiet matul id-diviżjoni taċ-ċelloli sabiex tissepura l-kromatidi ahwa.

Mikronukleji: Nukleji zgħar, separati minn u addizzjonali għan-nukleji prinċipali taċ-ċelloli, prodotti waqt it-telofazi ta' mitozi (mejozi) permezz ta' biċċiet ta' residwi ta' kromożomi jew kromożomi sħaħ.

Eritroċita normokromatika jew matura: Eritroċita matura għalkollox li tilfet l-RNA residwu li jifdal wara l-enukleazzjoni u/jew li tilfet markaturi taċ-ċelloli oħrajn b'hajja qasira li normalment jgħibu wara l-enukleazzjoni malli ssehh id-diviżjoni tal-eritroblast finali.

Eritroċita polikromatika jew immatura: Eritroċita fformata ġdida fi stadju intermedju tal-iżvilupp, li tlewwen kemm bil-komponenti blu kif ukoll homor tat-tilwin klassiku tad-dem bħall-Giemsas ta' Wright minhabba l-preżenza ta' RNA residwu fiċ-ċellola fformata ġdida. Ċelloli fformati ġodda bħal dawn huma bejn wiehed u iehor l-istess bħal retikuloċiti, li huma viżwalizzati bl-użu ta' kuluranti vitali li jikkaguna l-RNA residwu sabiex jagħqad fretikulu. Metodi oħrajn, inkluż it-tilwin monokromatiku tal-RNA b'kuluranti fluworexxenti jew tikkettar ta' markaturi tal-wiċċ b'hajja qasira bħas-CD71 b'antikorpi fluworexxenti, saru jintużaw ta' spiss sabiex tiġi identifikata ċ-ċellola hamra tad-dem iformattera ġdida. Eritroċiti polikromatiċi, retikuloċiti, u eritroċiti pożittivi għas-CD71 il-koll huma eritroċiti immaturi, għad li kull waħda minnhom għandha distribuzzjoni tal-età kemxejn differenti.

Retikuloċita: Eritroċita fformata ġdida mlewna b'kuluranti vitali li twassal sabiex l-RNA ċellolari residwi jagħqad fretikulu karatteristiku. Ir-retikuloċiti u l-eritroċiti polikromatiċi għandhom distribuzzjoni tal-età ċellolari simili.

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

▼ M7

Appendiċi 2

ID-DISINN FATTORJALI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TAD-DIFFERENZI FIS-SESSI FL-ASSAĠĠ *IN VIVO* TAL-MIKRONUKLEU**Id-disinn fattorjali u l-analiżi tiegħu**

F'dan id-disinn, jiġu ttestjati tal-inqas 5 irġiel u 5 nisa f'kull livell tal-konċentrazzjoni li jirriżultaw f'disinn li juża tal-inqas 40 animal (20 raġel u 20 mara, flimkien ma' kontrolli pozittivi rilevanti).

Id-disinn, li huwa wiehed mill-iktar disinni fattorjali sempliċi, huwa ekwivalenti għal analiżi bidirezzjonali tal-varjanza bis-sess u l-livell ta' konċentrazzjoni li huma l-effetti ewlenin. Id-dejta tista' tiġi analizzata billi jintużaw pakketti ta' softwer statistiku standard bħal SPSS, SAS, STATA, Genstat kif ukoll bl-użu ta' R.

L-analiżi tagħmel partizzjoni tal-varjabbiltà fis-sett ta' dejta bejn is-sessi, bejn il-konċentrazzjonijiet u b'raba mal-interazzjoni bejn is-sessi u l-konċentrazzjonijiet. Kull wiehed mit-termini jiġi ttestjat kontra stima tal-varjabbiltà bejn l-annimali rreplikati fi hdan il-gruppi ta' annimali tal-istess sess bl-istess konċentrazzjoni. Id-dettalji shah dwar il-metodoloġija sottostanti huma disponibbli f'hafna kotba standard dwar l-istatistika (ara r-referenzi) u fil-faċilitajiet tal-ghajjnuna pprovduti mal-pakketti statistiċi.

L-analiżi tkompli billi ssir spezzjoni tat-terminu ta' interazzjoni sess x konċentrazzjoni fit-tabella ANOVA ⁽¹⁾. Fin-nuqqas ta' terminu ta' interazzjoni sinifikanti, il-valuri kombinati bejn is-sessi jew fost il-livelli ta' konċentrazzjoni jipprovdu testijiet statistiċi validi bejn il-livelli bbażati fuq it-terminu tal-varjabbiltà tar-raggruppati fi hdan il-grupp tal-ANOVA.

L-analiżi tkompli billi tagħmel partizzjoni bejn l-istima tal-varjabbiltà bejn il-konċentrazzjonijiet f'kuntrasti li jipprovdu għal test għal kuntrasti lineari u kwadrati tar-risponsi bejn il-livelli tal-konċentrazzjonijiet. Meta jkun hemm interazzjoni sinifikanti sess x konċentrazzjoni, tista' ssir partizzjoni ta' dan it-terminu f'kuntrasti ta' interazzjoni lineari x sess u kwadradi x sess ukoll. Dawn it-termini jipprovdu testijiet ta' jekk ir-risponsi għall-konċentrazzjoni humiex paralleli għaż-żewġ sessi jew jekk hemmx rispons differenzjali bejn iż-żewġ sessi.

L-istima tal-varjabbiltà tal-miġburin fi hdan il-grupp tista' tintuża sabiex tipprovdi testijiet bejn il-pari tad-differenza bejn il-medji. Dawn il-paraguni jistgħu jsiru bejn il-medji għaż-żewġ sessi u bejn il-medji għal-livelli ta' konċentrazzjoni differenti bħal fil-każ tal-paraguni mal-livelli tal-kontroll negattiv. F'dawk il-każijiet li fihom ikun hemm interazzjoni sinifikanti, jistgħu jsiru paraguni bejn il-medji ta' konċentrazzjonijiet differenti fi hdan sess jew bejn il-medji tas-sessi fl-istess konċentrazzjoni.

Referenzi

Hemm hafna kotba dwar l-istatistika li jiddiskutu t-teorija, id-disinn, il-metodoloġija, l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-disinni fattorjali li jvarjaw mill-iktar analiżijiet b'żewġ fatturi sempliċi sal-iktar forum kumplessi użati fil-metodoloġija dwar id-“Disinn tal-Esperiment”. Din li ġejja mhijiex lista ezawrjenti. Uħud mill-kotba jipprovdu eżempji mahdumin ta' disinni komparabbli, f'ċerti każijiet b'kodiċi għat-tweqqif tal-analiżijiet bl-użu ta' diversi pakketti ta' softwer.

⁽¹⁾ L-esperti tal-istatistika li jiehdu approċċ għall-immudellar bħal dak li juża Mudelli Lineari Generali (GLMs) jistgħu jagħmlu l-analiżi b'mod differenti iżda paragunabbli iżda mhux bilfors iħaddmu t-tabella ANOVA tradizzjonali, li tmur lura għal approċċi algoritmici tal-kalkolu tal-istatistika żviluppata qabel il-miġja tal-kompjuters.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B**B.13/14. MUTAĠENIĊITÀ -TEST TA' MUTAZZJONI RIVERSIVA TA' BATTERJI****1. METODU**

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 471, Test ta' Mutazzjoni Riversiva ta' Batterji (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

It-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji juża aċidu amino li jehtieg kundizzjonijiet ta' *Salmonella typhimurium* u *Escherichia coli* biex jiġu żvelati mutazzjonijiet f'punti, li jinvolvu sostituzzjoni, żjeda jew thassir ta' par wiehed jew aktar ta' bażijiet DNA (1) (2) (3). Il-prinċipju tat-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji huwa li jiskopri mutazzjonijiet li jirrivertu mutazzjonijiet preżenti fil-kundizzjonijiet tat-test u jirrestitwixxu l-kapaċità funzjonali tal-batterja biex tissintetizza aċidu amino essenzjali. Il-batterji li jiġu lura jiġu skoperti mill-kapaċità tagħhom li jikbru fl-assenza ta' l-aċidu amino mehtieg mill-kundizzjonijiet tal-ġenitur tat-test.

Mutazzjonijiet f'punti huma l-kawża ta' hafna mard ġenetiku fil-bniedem u hemm xieħda sostanzjali li mutazzjonijiet f'punt f'onkoġeni u fil-ġeni ta' ċelluli somatiċi li jrażżnu t-tumuri huma involuti fil-formazzjoni ta' tumuri fil-bniedem u f'annimali ta' esperimenti. It-test ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji huwa rapidu, mhux għali u relattivament faċli biex jitwettagħ. Hafna mill-kundizzjonijiet tat-test għandhom diversi karatteristiċi li jagħmulhom aktar sensittivi għall-iskoperta ta' mutazzjonijiet inkluzi sekwenzi DNA responsivi fis-siti ta' reversjoni, permeabilità miżjuda ta' ċelloli għal molekuli kbar u l-eliminazzjoni ta' sistemi ta' riparazzjoni ta' DNA jew titjib ta' proċessi ta' riparazzjoni ta' DNA li huma suxxettibbli għall-iżbalji. L-ispeċifità tal-kundizzjonijiet tat-test jistgħu jipprovdu informazzjoni utli dwar it-tipi ta' mutazzjonijiet li huma kkawżati mill-aġenti ġenotossiċi. Bażi ta' informazzjoni kbira hafna ta' riżultati għal varjetà wiesgħa ta' strutturi hija disponibbli għal testijiet ta' mutazzjoni riversiva ta' batterji u ġew żviluppati metodoloġiji stabbiliti sew biex jittestjaw il-kimiċi b'karatteristiċi diversi fiżiko kimiċi, inkluzi komposti li jiżvintaw.

Ara wkoll l-Introduzzjoni ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Test ta' mutazzjoni riversiva jew fi *Salmonella typhimurium* jew f'*Escherichia coli* jiżvela mutazzjoni f' amino aċidu li jehtieg karatteristika (histidine jew tryptophan, rispettivament) biex jipproduċi karatteristika indipendenti minn forniture minn barra ta' aċidu amino.

Mutaġeni li jġibu s-sostituzzjoni ta' koppji ta' bażijiet huma aġenti li jikkawżaw bidla fil-baży tad-DNA. F'test reversiv din il-bidla tista' tirrikorri fil-lok tal-mutazzjoni oriġinali, jew f'xi tieni lok fil-genome batteriku.

Mutaġeni li jġibu l-mutazzjoni tal-faży tal-qari huma aġenti li jikkawżaw iż-żieda jew itthassir ta' pari ta' baży waħda jew aktar fid-DNA, u b'hekk jibdlu l-faży tal-qari tar-RNA.

▼B

1.3. KONSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

It-test tal-mutazzjoni batterika reversiva jutilizza Ċelloli prokarjotiċi, li huma differenti minn Ċelloli tal-mammiferi fil-karatteristiċi bħal ma huma l-assorbiment, il-metaboliżmu, l-istruttura tal-kromożomi u l-proċessi ta' riparazzjoni tad-DNA. It-testijiet li jitwettqu *in vitro* ġeneralment jehtieġu l-użu ta' għejun esoġenu għall-attivazzjoni metabolika. Sistemi ta' attivazzjoni metabolika *in vitro* ma jistgħux jissimulaw kompletament il-kundizzjonijiet *in vivo* fil-mammiferi. Għalhekk it-test ma jagħtix informazzjoni diretta fuq il-qawwa mutaġenika u karċinoġenika ta' sustanza fil-mammiferi.

It-test tal-mutazzjoni reversiva batterika normalment jintuża bħala l-ewwel pass għall-attività ġenossika u, b'mod partikolari, għall-attività li tohloq mutazzjoni puntiformi. Informazzjoni estensiva wriet li hafna kimiċi li huma positivi f'dan it-test juru wkoll attività mutaġenika f'testijiet oħra. Hemm eżempji ta' aġenti mutaġeniċi li ma jġiġux żvelati b'dan it-test; ir-raġunijiet għal dawn in-nuqqasijiet jistgħu jkunu attribwiti għan-natura speċifika tal-punt ta' laħhar żvelat, differenzi fl-attivazzjoni metabolika, jew differenzi fil-bijodisponibbiltà. Minnaha l-oħra, l-fatturi li jsaħħu s-sensittività tat-test tal-mutazzjoni reversiva batterika jistgħu jwasslu għal sopravvalutazzjoni ta' l-attività mutaġenika.

It-test tal-mutazzjoni reversiva batterika jista' ma jkunx xieraq għall-valutazzjoni ta' ċerti klassijiet ta' kimiċi, per eżempju komposti b'qawwa kbira batteriċida (eż. ċerti antibijotiċi) li dawk li huma maħsuba (jew huma magħrufa) li jiddisturbaw speċifikament is-sistema ta' replika ta' Ċelloli fil-mammiferi (eż. inibituri tat-topojso-merasi u ċerti analogi nukleosidi). F'dawn il-kazijiet jistgħu jkunu aktar xierqa testijiet fuq mutazzjoni fil-mammiferi.

Minkejja li hafna mill-komposti li huma positivi f'dan it-test huma karċinoġeni tal-mammiferi, il-korrelazzjoni mhijiex assoluta. Tiddependi fuq il-klassi tal-kimika u hemm karċinoġeni li ma jġiġux żvelati b'dan it-test għax jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi oħra li mhumiex ġenotossiċi jew mekkaniżmi li ma jeżistux f'ċelluli batteriċi.

1.4. PRINĊIPJI TAL-METODU TAT-TEST

Is-sospensjonijiet ta' Ċelloli batteriċi jiġu esposti għas-sustanza tat-test fil-presenza u fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika esoġenea. Fil-metodu ta' inkorporazzjonmi fuq bażi, dawn is-sospensjonijiet jithalltu ma' agar ta' kopertura u jitqiegħdu fuq il-baży minnufih fuq medjum minimu. Fil-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni, it-tahlita tat-trattament tiġi inkubata u imbagħad imħallta ma' agar ta' kopertura qabel titqiegħed fuq baży fuq medjum minimu. Għaž-żewġ metodi ta' teknika, wara jumejn ta' inkubazzjoni jew tlieta, jingħaddu l-kolonji revertanti u jiġu mqabbla man-numru ta' kolonji revertanti spontanji fuq il-bażijiet ta' kontroll tas-solvent.

Ġew deskritti hafna proċeduri għat-twettiq tat-test tal-mutazzjoni reversiva batterika. Fost dawk li ġeneralment jintużaw hemm il-metodu ta' inkorporazzjoni fuq baży (1) (2) (3) (4), il-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni (2) (3) (5) (6) (7) (8), il-metodu ta' fluttwazzjoni (9) (10), u l-metodu tas-sospensjoni (11). Ġew deskritti modifiki għall-ittestjar ta' gassijiet jew fwar (12).

▼B

Il-proċeduri deskritti fil-metodu jappartjenu primarjament għall-metodi ta' l-inkorporazzjoni fuq bażi u ta' qabel l-inkubazzjoni. Kull wiehied minnhom huwa aċċettabbli biex isiru esperimenti kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. Ċerti sustanzi jistgħu jiġu żvelati b'mod aktar effiċjenti meta jintuża l-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni. Dawn is-sustanzi jappartjenu għal klassijiet kimiċi li jinkludu nitrosamini alifatiċi short chain, metalli divalent, aldejidi, komposti ta' koloranti azo u dijażo, alkaloidi pirollizidini, komposti allil u nitro komposti (3). Hu rikonoxxut ukoll li ċerti klassijiet ta' mutaġeni mhux dejjem jiġu żvelati meta jintużaw proċeduri standard bħal ma huma l-metodu ta' l-inkorporazzjoni fuq bażi u l-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni. Dawn għandhom jitqiesu bħala “kazijiet speċjali” hu huwa bil-qawwa rakkomandat li jintużaw proċeduri alternattivi biex jiġu żvelati. Il-“kazijiet speċjali” li ġejjin jistgħu jiġu identifikati (flimkien ma' eżempji ta' proċeduri li jistgħu jintużaw biex jiġu żvelati): komposti ta' koloranti azo u dijażo (3) (5) (6) (13), kimiċi ta' gassijiet u fwar (12) (14) (15) (16) u glikosidi (17) (18). Kull devjazzjoni mill-proċedura standard tehtieg li tkun ġustifikata xjentifikament.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.5.1. **Preparazzjonijiet**1.5.1.1. *Batterja*

Kulturi friski ta' batterja għandhom jithallew jiżviluppaw sal-fażi esponenzali tardiva jew il-fażi bikrija stazzjonarja ta' l-Iżvilupp (madwar 109 Ċelloli kull ml). Ma għandhomx jintużaw kulturi fil-fażi stazzjonarja tardiva. Huwa essenzjali li l-kulturi li jintużaw fl-esperiment ikun fihom titolu għoli ta' batterja vijabbli. It-titolu jista' jintwera jew mill-informazzjoni storika ta' kontroll fuq il-fażijiet ta' iżvilupp, jew minn kull analiżi permezz tad-determinazzjoni ta' l-għadd ta' Ċelloli vijabbli bl-esperiment tal-baži.

It-temperatura rakkomandata għall-inkubazzjoni hi ta' 37 °C.

Għandhom jintużaw għallinqas hames karatteristiċi ta' batterji. Dawn għandhom jinkludu erba' karatteristiċi ta' *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 jew TA97a jew TA97; TA98; u TA100) li ġew pruvati li huma ta' min wiehied jorbot fuqhom u responsivi għar-riproduzzjoni bejn laboratorji. Dawn l-erba' karatteristiċi *S. typhimurium* għandhom pari bażiċi GC fuq il-lok ta' reversjoni primarja u huwa magħruf li jistgħu ma jiżvelawx ċerti mutaġeni ossidanti, aġenti li jipprovokaw il-cross-linking u idrażini. Dawn is-sustanzi jistgħu jiġu żvelati bil-karatteristiċi ta' *E. coli* WP2 jew *S. typhimurium* TA102 (19) li jkollhom par ta' baži AT fil-lok primarju ta' reversjoni. Għalhekk it-tagħqid rakkomandat ta' karatteristiċi huwa:

— *S. typhimurium* TA1535, u

— *S. typhimurium* TA1537 jew TA97 jew TA97a, u

— *S. typhimurium* TA98, u

— *S. typhimurium* TA100, u

— *E. coli* WP2 uvrA, jew *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), jew *S. typhimurium* TA102.

Biex jiġu żvelati mutaġeni cross-linking jista' jkun preferibbli li wiehied jinkludi TA102 jew li tiżdied karatteristika ta' riparazzjoni tad-DNA ta' *E. coli* (eż. *E. coli* WP2 jew *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Għandhom jintużaw proċeduri stabbiliti għall-preparazzjoni ta' kulturi primarji, verifika ta' l-immarkar u l-ħażna. Għandha tintwera l-htieġa ta' l-amino aċidu għall-lżvilupp għal kull kultura primarja ffrizata (istidina għal karatteristiċi ta' *S. typhimurium*, u triptofan għal karatteristiċi ta' *E. coli*). Karatteristiċi oħra fenotipici għandhom jiġu verifikati bl-istess mod, jiġifieri: il-presenza jew l-assenza ta' plasmidi tal-fattur R fejn ikun xieraq (jiġifieri r-resistenza għall-ampicillina fil-karatteristiċi ta' TA98, TA100, u TA97a jew TA97, WP2 uvrA u WP2 uvrA (pKM101), u resistenza għall-ampicillina + tetraciklina fil-karatteristika TA 102); il-presenza ta' mutazzjonijiet karatteristiċi (jiġifieri mutazzjoni rfa mutation fi *S. typhimurium* permezz ta' sensittività għal kristalvjola, u mutazzjoni uvrA fi *E. coli* jew mutazzjoni uvrB mutation fi *S. typhimurium*, permezz ta' sensitività għal dawl ultravjola) (2) (3). Il-karatteristiċi għandhom ukoll jipproduċu numru ta' bażijiet ta' kolonji revertanti spontani fi ħdan il-meddi ta' frekwenza mistennija mill-informazzjoni storika ta' kontroll tal-laboratorji u preferibbilment fil-medda msemmija fil-letteratura.

1.5.1.2. *Medjum*

Jintuża agar minimu xieraq (eż. li jkun fiħ medjum E minimu ta' Vogel-Bonner u glukozju), u agar ta' kopertura li jkun fiħ istidina u bijotin jew triptofan biex jippermetti fit diviżjonijiet ta' Ċelloli (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Attivazzjoni metabolika*

Il-batterja għandha tiġi esposta għas-sustanza tat-test kemm fil-presenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Is-sistema li normalment l-aktar tintuża hija frazzjoni post mitokondrijali integrata ta' kofattur (S9) ippreparata mill-fwied ta' annimali gerriema trattata b'aġenti li jipprokuraw l-enżimi bħal ma huma l-Aroclor 1254 (1) (2) jew komposizzjoni ta' phenobarbitone u β-naphthoflavone (18) (20) (21). Il-frazzjoni post mitokondrijali normalment tintuża f'konċentrazzjonijiet fil-medda minn 5 sa 30 % v/v fit-tahlita S9. L-għażla u l-kundizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi fuq il-klassi tal-kimika li tintuża. F'ċerti każijiet, jista' jkun xieraq li jintużaw aktar minn konċentrazzjoni waħda ta' frazzjon post mitokondrijali. Għal komposti ta' koloranti azo u dijażo, jista' jkun aktar xieraq li tintuża sistema ta' attivazzjoni metabolika (6) (13).

1.5.1.4. *Sustanza/preparazzjoni tat-test*

Sustanzi solidi tat-test għandhom jiddewbu jew jiġu sospizi f'solventi jew mezz xierqa u dilwiti kif ikun xieraq qabel ma tiġi ttrattata l-batterja. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiżdiu direttament mas-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet ġodda sakemm l-informazzjoni ta' l-istabbiltà ma turix li jistgħu jinħażnu.

Ma għandhux jkun hemm suspett ta' reazzjoni kimika tas-solvent/mezz mas-sustanza tat-test u dan is-solvent/mezz għandu jkun kompatibbli mas-sopravvivenza tal-batterja u ma' l-attività S9 (22). Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra magħrufa, l-inkluzjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Huwa rakkomandat li kull fejn ikun possibbli għandu l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż. Meta jiġu ttestjati sustanzi li mhumiex stabbli fl-ilma, is-solventi organiċi li jintużaw ma għandhux ikollhom ilma.

▼B**1.5.2. Kundizzjonijiet tat-test****1.5.2.1. Karatteristiċi tat-test (Ara 1.5.1.1)****1.5.2.2. Konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni**

Fost il-kriterji li għandhom jitqiesu meta jiġi determinat l-oġġla ammont tas-sustanza tat-test li għandha tintuża hemm il-ċitotossicità u s-solubilità fit-tahlita ta' trattament finali.

Jista' jkun utli li jiġu stabbiliti t-tossicità u l-insolubilità f'esperiment preliminari. L-ċitotossicità tista' tiġi żvelata b'riduzzjoni fl-ghadd ta' konolonji revertanti, bid-dehra ta' żvilupp a normali tal-fond, jew bil-grad ta' sopravivenza tal-kulturi ttrattati. L-ċitotossicità ta' sustanza tista' tinbidel fil-preżenza ta' sistemi ta' attivazzjoni metabolika. L-insolubilità għandha tiġi stmata b'hal preċipitazzjoni fit-tahlita finali taht il-kundizzjonijiet attwali tat-test u tkun evidenti għall-ghajn minghajr għanjuna.

Il-konċentrazzjoni massima rakkomandata għat-test għal sustanzi solubbli li mhumiex ċitotossiċi hija 5mg/baži jew 5µl/baži. Għal sustanzi li mhumiex ċitotossiċi u li ma jinhallux fuq 5mg/baži jew 5 µl/baži u wahda mill-konċentrazzjonijiet ittestjati jew aktar għandha tkun mhux solubbli fit-tahlita finali tat-trattament. Sustanzi tat-test li huma diġà ċitotossiċi taht il-5mg/baži jew 5 µl/baži għandhom jiġu ttestjati sa konċentrazzjoni ċitotossika. Dak li jippreċipita ma għandux jiddisturba l-ghadd.

Għandhom jintużaw għallinqas hames konċentrazzjonijiet differenti analizzabbli tas-sustanza tat-test b'madwar intervalli ta' semi logaritmici (jiġifieri $\sqrt{10}$) bejn punti tat-test għal esperiment inizjali. Jistgħu ikunu xierqa intervalli iqsar meta jkun qed jiġi investigat rispons ta' konċentrazzjoni. Testjar għola mill-konċentrazzjoni ta' 5mg/baži jew 5 µl/baži jista' jiġi kkunsidrat meta ssir il-valutazzjoni ta' sustanzi li jkollhom ammonti sostanzjali ta' impuritajiet potenzjalment mutageniċi.

1.5.2.3. Kontrolli negattivi u pożittivi

Kontrolli (solvent jew mezz) pożittivi u negattivi konkurrenti speċifiċi għall-kwalitajiet, kemm b'attivazzjoni metabolika jew minghajr, għandhom jiġu inklużi f'kull eżami. Għandhom jintgħażlu konċentrazzjonijiet ta' kontrolli pożittivi li juru l-prestazzjoni effettiva ta' kull eżami.

Għal eżamijiet li jagħmlu użu minn sistema ta' attivazzjoni metabolika, is-sustanza (i) ta' referenza ta' kontrolli pożittivi għandha(hom) tingħażel fuq baži tat-tip tal-kwalitajiet ta' batterja użati.

Is-sustanzi li ġejjin huma eżempji ta' kontrolli pożittivi xierqa għal eżamijiet ta' attivazzjoni metabolika:

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
781-43-1	212-308-4	9,10- Dimetil-antraċena
57-97-6	200-359-5	7,12- Dimetilbenz(a)antraċena
50-32-8	200-028-5	Benzo(a)pirena
613-13-8	210-330-9	2-Amino-antraċena

▼B

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
50-18-0		Ċiklofosfamida
6055-19-2	200-015-4	Monoidrat taċ-ċiklofosfamida

Is-sustanza li ġejja hija kontrolli pożittiv xieraq għall-metodu ta' attivazzjoni metabolika riduttiva:

Nri CA	NRI EINECS	Ismijiet
573-58-0	209-358-4	Congo Red

It-2-Aminoantraċena ma għandhiex tintuża bħala l-uniku indikatur ta' l-effikaċja tat-tahlita S9. Jekk tintuża t-2-aminoantraċena, kull lott ta' S9 għandu jkun karatterizant b'mutagen li jehtieg l-attivazzjoni metabolika b'enzimi mikrosomali, eż. benzo(a)pirena, dimetilbenzantraċena.

Is-sustanzi li ġejjin huma eżempji ta' kontrolli pożittivi skond karatteristiċi speċifiċi għal eżamijiet imwettqa minghajr is-sistema ta' attivazzjoni metabolika essoġena:

NRI CAS	NRI EINECS	ISMIIJET	Strain
26628-22-8	247-852-1	Ażidu tas-sodju	TA 1535 u TA 100
607-57-8	210-138-5	2 Mikrofluworena	TA 98
90-45-9	201-995-6	9 Aminoakridina	TA 1537, TA 97 u TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 u TA 97a
80-15-9	201-254-7	Iperossidu tal-Kumena	TA 102
50-07-7	200-008-6	Mitomycin C	WP2 uvrA u TA102
70-25-7	200-730-1	N-etil-N-nitro-3-nitro-N-nitrosogwanidina	WP2, WP2uvrA u WP2uvrA (pK M101)
56-57-5	200-281-1	4-Nitrokwinolina-1-ossidu	WP2, WP2uvrA u WP2uvrA(pK M101)
3688-53-7		Furilfuramida (AF2)	Karatteristiċi li fihom il-plasmid

Jistgħu jintużaw sustanzi ta' referenza ta' kontrolli pożittiv xierqa ohra. Għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontrolli pożittiv li huma relatati ma' klassijiet ta' kimiċi, meta dan ikun possibbli.

Għandhom jiġu inkluzi kontrolli negattivi, li jikkonsistu biss f'solvent jew mezz, minghajr sustanza tat-test, u mod ieħor ittrattati bl-istess mod bħal gruppi ta' trattament. B'zieda ma dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakamm ma jkunx hemm informazzjoni storika ta' kontrolli li turi li s-solvent magħżul ma jgħibx effetti ta' hsara jew mutageniċi.

▼B**1.5.3. Proċedura**

Għall-metodu ta' inkorporazzjoni fuq bażi (1) (2) (3) (4), minghajr l-attivazzjoni metabolika, normalment 0,05 jew 0,1 ml tas-soluzzjoni-jiet tat-test, 0,1 ml ta' kulturi friski ta' batterja (li jkun fihom madwar 108 ċelloli vijabbli u 0,5 ml ta' tarka sterili jithalltu ma' 2,0 ml ta' agar ta' kopertura. Għall-eżami bl-attivazzjoni metabolika, normalment 0,5 ml tat-tahlita ta' l-attivazzjoni metabolika li jkun fiha ammont adegwat ta' frazzjoni post mitokondrijali (fil-medda ta' 5 sa 30 % v/v fit-tahlita ta' l-attivazzjoni metabolika) jithalltu ma' agar ta' kopertura (2,0 ml) flimkien mal-batterja u mas-sustanza tat-test/soluzzjoni tat-test. Il-kontenut ta' kull tubu jiġi mhallat u jitferra fuq superfiċi ta' bażi b'agar minimu. L-agar ta' kopertura jithalla jsir solidu qabel l-inkubazzjoni.

Għall-metodu ta' qabel l-inkubazzjoni (2) (3) (5) (6), is-sustanza tat-test/soluzzjoni tat-test tiġi inkubata minn qabel mal-karatteristika tat-test (li jkun fiha madwar 108 Ċelloli vijabbli u t-tarka sterili jew is-sistema ta' attivazzjoni metabolika, 0,5ml) ġeneralment għal 20 minuta jew aktar f'temperatura ta' 30- 37°C qabel ma tithallat ma' l-agar ta' kopertura u titferra fuq superfiċi ta' bażi ta' agar minimu. Ġeneralment 0,05 jew 0,1 ml tas-sustanza tat-test/soluzzjoni tat-test, 0,1 ml ta' batterja u 0,5ml ta' tahlita S9 jew tarka sterili jithalltu ma' 2,0 ml ta' agar ta' kopertura. It-tubi għandhom jithallew li tidhol l-arja fihom fl-istadju ta' qabel l-inkubazzjoni billi jintuża aġitatur.

Biex issir stima xierqa tal-varjazzjoni, għandhom jintużaw tarki ittriplikati għal kull livell ta' doża. L-użu ta' tarka duplikata hija aċċettabbli meta xjentement ġustifikata. It-telfa ta' kull tant ta' bażi ma tinvalidax it-test neċessarjament.

Sustanzi gassużi jew volatili għandhom jiġu ttestjati b'metodi xierqa, bħalma huma mezzi magħluqa (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Inkubazzjoni

Il-bażijiet kollha f'eżami partikolari għandhom jiġu inkubati ta' 37 °C għal 48-72 siegħa. Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni, għandu jingħadd in-numru ta' kolonji revertanti kull bażi.

2. DATA**2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI**

Informazzjoni għandha tiġi preżentata bħala numru ta' kolonji revertanti kull bażi. Għandu jingħata wkoll in-numru ta' kolonji revertanti kemm dwar bażijiet ta' kontroll negattivi (kontroll tas-solvent, u kontroll mhux trattat, jekk ikun ġie użat) kif ukoll bażijiet ta' kontroll pożittivi. L-għadd ta' bażijiet individwali, in-numru medju ta' kolonji revertanti kull bażi u d-devjazzjoni standard għandhom jiġu preżentati għas-sustanza tat-test u għall-kontrolli pożittivi u negattivi (mhux trattati u/jew tas-solvent).

Ma hemmx hteġa ta' verifika għal rispons pożittiv ċar. Riżultati ambigwi għandhom jiġu ċċarati b'permezz ta' aktar testijiet preferibbilment billi jkun hemm modifika fil-kundizzjonijiet ta' l-esperiment. Riżultati negattivi għandhom jiġu konfermati fuq il-baży ta' każ b'każ. F'dawk il-każijiet fejn il-konferma ta' riżultati negattivi mhiex ikkunsidrata bħala negattiva, trid tingħata ġustifikazzjoni. Modifikazzjonijiet ta' parametri ta' studju sabiex tiġi estiza l-medda tal-kundizzjonijiet stmati għandha tiġi kkunsidrata f'esperimenti ta' wara. Parametri ta' studju li jisgħu jiġu modifikati jinkludu l-ispazjar tal-konċentrazzjoni, il-metodu ta' trattament (inkorporazzjoni mal-baży jew qabel l-inkubazzjoni fil-likwidu), u kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika.

▼B**2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TA' RIŻULTATI**

Hemm diversi kriterji sabiex jiġi determinat riżultat pożittiv, bhal zieda ta' relata mal-konċentrazzjoni matul il-medda ttestjata u/jew zieda riproducibbli f'konċentrazzjoni waħda jew aktar fin-numru ta' kolonji revertanti kull bażi f'mill-inqas karatteristika waħda b'sistema ta' attivazzjoni metabolika jew mingħajrha (23). Għandha tiġi kunsidrata l-ewwel ir-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Jistgħu jintużaw metodi ta' statistika bħala għanjuna għal valutazzjoni tar-riżultati tat-test (24). Madankollu, is-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal rispons pożittiv.

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma josservawx il-kriterji fuq imsemmija hija kkunsidrata bħala mhux mutaġenika f'dan it-test.

Minkejja li hafna esperimenti jagħtu riżultati ċari, pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni mogħtija ma tippermettix li jsir għidizzju definitiv dwar l-attività tas-sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ambigwi jew dubbjużi rrispettivament min-numru ta' drabi li jiġi ripetut l-esperiment.

Riżultati pożittivi mit-test ta' mutazzjoni reversibbli batterika jindikaw li s-sustanza tiġġenera mutazzjonijiet mal-punt permezz ta' sostituzzjonijiet fuq il-baži jew tibdiliet fil-parametri tal-ġenomu ta' jew *Salmonella typhimurium* u/jew *Escherichia coli*. Riżultati negattivi jindikaw li taht il-kundizzjonijiet tat-test is-sustanza tat-test mhix mutaġenika fl-ispeċi ttestjata.

3. RAPPORTAĠĠ**3.1. RAPPORT TAT-TEST**

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

Solvent/mezz:

- ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/mezz;
- solubilità u stabbiltà tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Karatteristiċi:

- Karatteristiċi użati;
- numru ta' ċelluli kull kultura;
- dettalji tal-karatteristiċi.

Kundizzjonijiet tat-Test:

- ammont tas-sustanza tat-test kull bażi (mg/baži jew µl/baži) flimkien mar-raġuni bażija għall-għażla tad-doża u n-numru ta' bażijiet kull konċentrazzjoni;
- medja użata;
- tip u komposizzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika, inklużi l-kriterji ta' aċċettazzjoni;
- proċeduri tat-trattament.

Riżultati:

- sinjali ta' tossiċità;
- sinjali ta' preċipitazzjoni;
- għadd ta' bażijiet individwali;

▼B

- in-numru medju ta' kolonji rivertanti kull bażi u devjazzjoni standard;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;
- analizi statistiċi, jekk ikun hemm;
- informazzjoni dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, fl-istess hin, bil-meded, mezz, u devjazzjonijiet standard;
- informazzjoni dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, storiċi, bil-meded, mezz, u devjazzjonijiet standard.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konkluzjonijiet.

4. **REFERENZI**

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.
- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.
- (14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen., 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, Cancer Res., 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼ B

- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼ M7

▼B

B.17. MUTAĠĠENĠĠITÀ –TEST TAL-MUTAZZJONI TAL-GENETIĠ-ĠELLULA TAL-MAMMIFERI *IN VITRO*

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika tal-OECD TG 476, Test tal-Mutazzjoni tal-Ġene taĠ-Ġellula tal-Mammiferi *In vitro* (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

It-test tal-mutazzjoni tal-Ġene taĠ-Ġellula tal-mammiferi *in vitro* jista' jintuza biex jiġu żvelati mutazzjonijiet tal-Ġene miġjuba minn sustanzi kimiċi. Il-linji ta' Ġelloli xierqa jinkludu L5178Y Ġelloli mouse lymphoma, il-linji CHO, CHO-AS52 u V79 ta' Ġelluli ta' Chinese hamster, u Ġ-Ġelloli umani lymphoblastoid TK6 (1). F'dawn il-linji ta' Ġelloli l-punti tat-truf Ġenetiċi li l-aktar jintużaw ikejlu l-mutazzjoni fi thymidine kinase (TK) u hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), u transĠene ta' xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (XPRT). It-testijiet ta' mutazzjoni TK, HPRT u XPRT jiżvelaw dehriet differenti ta' Ġrajijiet Ġenetiċi. Il-lok awtosomali ta' l-TK u l-XPRT jista' jippermetti l-iżvelar ta' ċerti Ġrajijiet Ġenetiċi (eż. hafna thassir) li mhumex żvelati fil-locus HPRT locus fuq kromożomi X (2)(3)(4)(5)(6).

Fit-test tal-mutazzjoni tal-Ġene taĠ-Ġellula tal-mammiferi *in vitro*, jistġu jintużaw kulturi ta' linji ta' Ġelloli jew karatteristiċi ta' Ġelloli. IĠ-Ġelloli li jintużaw jinghażlu fuq il-baži tal-kapaċità tagħhom li jiżviluppaw f'kultura u l-istabbiltà fil-frekwenza ta' mutazzjoni spontanea.

Generalment it-testijiet imwettqa *in vitro* jehtieġu l-użu ta' ghejun esoĠeneu ta' attivazzjoni metabolika. Din is-sistema ta' attivazzjoni metabolika ma tista'x tikkopja kompletament il-kundizzjonijiet *in vivo* fil-mammiferi. Wiehed għandu jevita kundizzjonijiet li jistġu jwasslu għal riżultati li ma jirriflettux mutaĠeneċità intrinsika. Jista' jkun hemm riżultati posittivi li ma jirriflettux mutaĠeneċità intrinsika minn bidliet fil-pH, osmolalità jew livelli għolja ta' ċitotossicità (7).

Dan it-test jintuza biex tiġi individwata l-possibbiltà ta' mutageni u karċinoĠeni fil-mammiferi. Hafna komposti li huma posittivi f'dan it-test huma karċinoĠeni fil-mammiferi; madankollu, m'hemmx korrelazzjoni perfetta bejn dan it-test u l-karċinoĠeniċità. Il-korrelazzjoni tiddependi fuq il-klassi kimika u hemm evidenza dejjem tiżdied li jeżistu karċinoĠeni li ma jiġux żvelati b'dan it-test għax jidhru li jaĠixxu permezz ta' mekkaniżmi oħra mhux Ġenotossiċi jew mekkaniżmi li ma jeżistux f'Ġelloli batteriċi (6).

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali Taqsima B:

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Mutazzjoni 'l quddiem: mutazzjoni tal-Ġene mit-tip parental itall-forma mutanti li tohloq alterazzjoni jew telf ta' l-attività enzimatika tal-funzjoni tal-proteina kodifikata.

MutaĠeni li jĠibu s-sostituzzjoni tal-koppji tal-baži: sustanzi li jikkawżaw is-sostituzzjoni ta' koppji tal-baži wahda jew aktar fid-DNA.

MutaĠeni li jĠibu l-mutazzjoni tal-faži tal-qari: sustanzi li jikkawżaw iż-żieda jew itthassir ta' pari ta' baži wahda jew multipli fil-molekula tad-DNA.

▼B

Hin ta' espressjoni fenotipika: perjodu li fih prodotti ta' gene mhux mibdula jitnehhew mill-ghadd ta' Ċelloli vijabbli.

Frekwenza mutanti: l-ghadd ta' Ċelloli mutanti osservati diviżi bl-ghadd ta' Ċelloli vijabbli.

Żvilupp totali relattiv: zieda fl-ghadd ta' Ċelloli tul iż-żmien komparata ma' popolazzjoni ta' Ċelloli ta' kontroll; kalkolat bhala l-prodott ta' l-iżvilupp tas-sospensjoni relattiv ghaż-żminijiet ta' kontroll negattiv għall-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva għall-kontroll negattiv.

Żvilupp tas-sospensjoni relattiv: zieda fl-ghadd ta' Ċelloli tul il-perjodu ta' espressjoni relattiv għall-kontroll negattiv.

Vijabilità: l-effiċjenza tal-klonazzjoni ta' ċelluli trattati fil-hin ta' meta jitqiegħdu fuq bazi f'kundizzjonijiet selettivi wara l-perjodu ta' espressjoni.

Sopravivenza: l-effiċjenza tal-klonazzjoni ta' Ċelloli trattati meta jitqiegħdu fuq bazi wara li jintemm il-perjodu ta' trattament; generalment is-sopravivenza hija espresso paragonata mas-sopravivenza tal-popolazzjoni ta' Ċelloli ta' kontroll.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Iċ-Ċelloli li għandhom nuqqas ta' thymidine kinase (TK) minhabba fil-mutazzjoni TK+/- > TK-/- huma rezistenti għall-effetti ċitotossici tal-pyrimidine analogue trifluorothymidine (TFT). Iċ-ċelluli profiċenti tat-Thymidine kinase huma sensitivi għat-TFT, li johloq l-inibizzjoni tal-metaboliżmu ċellulari u jwaqqaf aktar diviżjoni fiċ-Ċelloli. B'hekk Ċelloli mutanti jistghu jipproliferaw fil-presenza tat-TFT, waqt li Ċelloli normali, li jkun fihom it-thymidine kinase, ma jistghux. Bl-istess mod, Ċelloli li għandhom nuqqas ta' HPRT jew XPRT jingħazlu skond ir-reżistenza għal 6-thioguanine (TG) jew 8-azaguanine (AG). Il-karatteristiċi tas-sustanza tat-test għandhom jiġu meqjusa sew jekk jiġi ttestjat analogu tal-bazi jew compost relatat ma' l-aġent selettiv f'xi wiehed mit-testijiet tal-mutazzjoni tal-gene ta' ċellula fil-mammiferi. Bhala eżempju, għandha tiġi investigata kull tossiċità selettiva suspettata bis-sustanza tat-test għal ċelluli mutanti u mhux mutanti. Għalhekk, il-prestazzjoni tas-sistema/aġent tas-selezzjoni għandha tiġi konfermata meta jiġu ttestjati kimiċi li huma strutturalment relatati ma' l-aġent selettiv (8).

Iċ-Ċelloli f'sospensjoni jew kultura monostrata huma esposti għas-sustanza tat-test, kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha, għal perjodu ta' żmien xieraq u subkulturali biex jippermettu l-espressjoni fenotipika qwabel is-selezzjoni mutanti (9) (10) (11) (12) (13). Normalment iċ-ċitossicità tiġi stabbilita billi titkejjel l-effiċjenza ta' klonazzjoni relattiva (sopravivenza) jew l-iżvilupp totali relattiv tal-kulturi wara l-perjodu ta' trattament. Il-kulturi ttrattati jinzammu f'medjum ta' żvilupp għal perjodu ta' żmien suffiċjenti, karatteristiku ta' kull locus magħżul u tip ta' ċellula, biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kwazi ottimali tal-mutazzjonijiet magħmula. Il-frekwenza mutanti tiġi stabbilita bl-inseminazzjoni ta; għadd magħruf ta' Ċelloli f'medjum li jkun fih l-aġent selettiv biex jiġu żvelati Ċelloli mutanti u f'medjum mingħajr aġent selettiv biex tiġi żvelata l-effiċjenza tal-klonazzjoni (vijabilità). Wara perjodu xieraq ta' inkubazzjoni, jingħaddu l-kolonji. Il-frekwenza mutanti hi derivate mill-ghadd ta' kolonji mutanti f'medjum selettiv u l-ghadd ta' kolonji f'medjum mhux selettiv.

▼B

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**1.4.1.1. *Ċelloli*

Hemm varjetà ta' Ċelloli disponibbli għall-użu għal dan it-test inklużi subkloni ta' Ċelloli ta' L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 jew TK6. It-tipi ta' Ċelloli użati f'dan it-test għandhom ikunu ddimostraw sensitività għal mutaġeni kimiċi, effiċjenza għolja ta' klonazzjoni u frekwenza mutanti spontanea stabbli. Iċ-Ċelloli għandhom jiġu kontrollati għal kontaminazzjoni mill-mikoplasma u m'għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati.

It-test għandu jkun iddisinjat biex ikollu sensitività u qawwa predefinita. L-għadd ta' ċelluli, kulturi u konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test użati għandhom jirriflettu dawn il-parametri definiti (14). L-għadd minimu ta' Ċelloli vijabbli li jinqgħu hajjin wara it-trattament u li jintużaw f'kull stadju tat-test għandu jkun msejjes fuq il-frekwenza tal-mutazzjoni spontanea. Gwida ġenerali hija li jintuża għadd ta' Ċelloli li hu għall-inqas 10 darbiet l-invers tal-frekwenza tal-mutazzjoni spontanea. Madankollu, huwa rakkomandat li jiġu uttilizzati għall-inqas 106 Ċelloli. Informazzjoni storika xierqa dwar is-sistema taċ-ċellula użata għandha tkun disponibbli biex tindika l-prestazzjoni konsistenti tat-test.

1.4.1.2. *Postijiet u kundizzjonijiet tal-kulturi*

Għandhom jintużaw postijiet tal-kulturi xierqa, u kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni (kontenituri tal-kulturi, temperatura, konċentrazzjoni ta' CO₂ u umdità). Il-postijiet għandhom jingħazlu skond is-sistemi selettivi u t-tip ta' ċellula użati f'dan it-test. Huwa partikolarment importanti li l-kundizzjonijiet tal-kulturi jingħazlu hekk li jiżguraw l-iżvilupp ottimali taċ-Ċelloli waqt il-perjodu ta' espressjoni u l-kapaċità tal-formazzjoni ta' kolonji ta' kemm iċ-ċelluli mutanti kif ukoll dawk mhux mutanti.

1.4.1.3. *Preparazzjoni tal-kulturi*

Iċ-Ċelloli huma propagati minn hażniet ta' kulturi, inseminati f'medjum ta' kultura u inkubati f'temperatura ta' 37 °C. Qabel ma jintużaw f'dan it-test, il-kulturi għandhom jitnaddfu minn Ċelloli mutanti pre-eżistenti.

1.4.1.4. *Attivazzjoni metabolika*

Iċ-ċelluli għandhom jiġu esposti għas-sustanza tat-test kemm fil-preżenza kif ukoll fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Is-sistema l-aktar użata hija frazzjoni post mitokondrijali supplementata b'kofattur (S9) preparata mill-fwied ta' annimali gerriema trattat b'aġenti li jġibu l-enzimi bħal ma huma l-Aroklor 1254 (15) (16) (17) (18) jew tahlita ta' phenobarbitone u β-naphthoflavone (19) (20).

Normalment il-frazzjon post mitokondrijali tintuża f'konċentrazzjonijiet fil-medda minn 1-10 % v/v fil-medjum finali tat-test. L-għażla u l-kundizzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika tista' tiddependi fuq il-klassi tal-kimika li tkun qed tiġi ttestjata. F'certi każijiet jista' jkun xieraq li tiġi uttilizzata iktar minn konċentrazzjoni waħda tal-frazzjon post mitokondrijali.

▼B

Numru ta' żviluppi, inkluża l-konstruzzjoni ta' linji ta' Ċelloli ta' inginerija ġenetika li jesprimu enzimi ta' attivazzjoni speċifika, jistgħu jipprovdu l-potenzal għall-attivazzjoni endoġenea. L-għażla tal-linji taċ-Ċelloli użati għandha tkun ġustifikata xjentifikament (eż. bir-rilevanza ta' l-isoenzim ċitokromu P450 għall-metabolizmu tas-sustanza tat-test).

1.4.1.5. *Preparazzjoni tas-sustanza tat-test*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewba jew sospizi f'solventi jew mezzi xierqa u dilwiti jekk ikun xieraq qabel it-trattament taċ-Ċelloli. Sustanzi tat-test likwidi jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistemi tat-test u/jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet godda tas-sustanza tat-test sakemm l-informazzjoni dwar l-istabbiltà ma turix l-aċċettabbiltà tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Ma għandux jkun hemm suspett ta' reazzjoni kimika tas-solvent/-mezz mas-sustanza tat-test u s-solvent/mezz għandu jkun kompatibbli mas-sopravivenza taċ-Ċelloli u l-attività S9. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra magħrufa, l-inklużjoni tagħhom għandha tkun sostnuta b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Huwa rakkomandat li kull fejn ikun possibbli l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż. Meta jiġu testjati sustanzi li mhumx stabbli fl-ilma, is-solventi organiċi li jintużaw ma għandhux ikollhom ilma. L-ilma jista' jgħid li jgħid billi jiżdied passatur molekulari.

1.4.2.2. *Konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni*

Fost il-kriterji li għandhom jitqiesu biex tiġi stabbilita l-ogħla konċentrazzjoni hemm iċ-ċitossicità, is-solubilità fis-sistema tat-test u bidliet fil-pH jew osmolalità.

Iċ-ċitossicità għandha tiġi stabbilita bl-attività metabolika jew mingħajrha fl-esperiment prinċipali bl-użu ta' indikazzjoni xierqa ta' integrità u żvilupp taċ-Ċelloli, bħal ma huma l-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva (sopravivenza) jew l-iżvilupp totali relattiv. Jista' jkun utli li jiġu determinati iċ-ċitossicità u s-solubilità f'esperiment preliminari.

Għandhom jintużaw għall-inqas erba' konċentrazzjonijiet analizzabbli. Fejn ikun hemm iċ-ċitossicità, dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom ikopru medda mill-massimu għal ftit jew l-ebda ċitossicità. Dan normalment ifisser li l-livelli ta' ċitossicità għandhom jiġu separati b'mhux iżjed minn fattur bejn 2 u $\sqrt{10}$. Jekk il-konċentrazzjoni massima hi msejsa fuq iċ-ċitossicità allura għandha tirriżulta f'madwar 10-20 % (iżda mhux inqas minn 10 %) sopravivenza relattiva (effiċjenza ta' klonazzjoni relattiva) jew żvilupp totali relattiv. Għal sustanzi relattivament mhux tossiċi, il-konċentrazzjoni massima tat-test għandha tkun 5 mg/ml, 5 µl/ml, jew 1,01 M, liema minnhom ikun l-anqas.

▼B

Sustanzi relattivament mhux solubbli għandhom jiġu ttestjati sa jew lil hinn mil-limitu tagħhom ta' solubilità taht kundizzjonijiet ta' kulturi. Il-prova tas-solubilità għandha tiġi stabbilita fil-medjum tat-trattament finali li għalih huma esposti ċ-Ċelloli. Jista' jkun utli li tiġi valutata s-solubilità fil-bidu u fl-aħħar tat-trattament, għax is-solubilità tista' tinbidel waqt il-kors ta' l-espozizzjoni fis-sistema tat-test minhabba fil-preżenza ta' Ċelloli, S9, serum eċċ. L-insolubilità tista' tiġi żvelata minghajr għajjnuna lill-għajn. Il-precipitat m'għandux jostakola l-għadd.

1.4.2.3. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inkluzi f'kull esperiment kontrolli posittivi u negattivi fl-istess hin (solvent jew mezz), kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll minghajrha. Meta tintuża l-attivazzjoni metabolika, il-kimika ta' kontroll posittiva għandha tkun dik li-tehtieg li l-attivazzjoni tagħti rispons mutageniku.

Eżempji ta' sustanzi ta' kontroll posittiv jinkludu:

Kondizzjoni ta' attivazzjoni metabolika	Post	Sustanza	Nru CAS	Nru EINECS
Assenza ta' attivazzjoni metabolika essogēnea	HPRT	Metansulfonat ta' l-etil	62-50-0	200-536-7
		Ethyl nitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (kolonji zghar u kbar)	Methyl methanesulphonate	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Etil methanesulphonate	62-50-0	200-536-7
		Nitrosourea ta' l-etil	759-73-9	212-072-2
Preżenza ta' attivazzjoni metabolika essogēnea	HPRT	3-Methylcholanthrene	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimethylbenzanthracene	57-97-6	200-359-5
	TK (kolonji zghar u kbar)	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
		Cyclophosphamide monohydrate	6055-19-2	
		Benzo(a)pirena	50-32-8	200-028-5
		3-Metilkolantrena	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimethylamine (għal livelli għoljin ta' S-9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo(a)pirena	50-32-8	200-028-5

Jistgħu jintużaw sustanzi ta' referenza ta' kontroll posittiv oħra xierqa, eż. jekk laboratorju jkollu bażi ta' informazzjoni storika fuq 5-bromo 2'-deoxyuridine (Nru CAS 59-14-3, Nru EINECS 200-415-9), tista' tintuża ukoll din is-sustanza ta' referenza. Meta jkunu disponibbli, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontroll posittiv relatat ma' klassi ta' kimika.

▼ B

Għandhom jiġu inklużi kontrolli negattivi, li jikkonsistu biss f'solvent jew mezz fil-medjum ta' trattament, u trattati bl-istess mod b'hall-gruppi ta' trattament. B'zieda ma' dan għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakemm l-informazzjoni storika ta' kontroll turi li ma jkunx hemm effetti dannużi jew mutageniċi kkawżati mis-solvent magħżul.

1.4.3. **Proċedura**1.4.3.1. *Trattament bis-sustanza tat-test*

Iċ-Ċelloli li jipproliferaw għandhom jiġu esposti għas-sustanza tat-test kemm bl-attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajrha. L-espozizzjoni għandha tkun għal perjodu xieraq ta' żmien (normalment 3-6 sigħat hu effettiv). Il-hin ta' l-espozizzjoni jista' jittawwal fuq ciklu ta' Ċelloli wiehed jew aktar.

Jistghu jintużaw kulturi ttrattati duplikati jew singoli ma' kull konċentrazzjoni ttestjata. Meta jintużaw kulturi singoli, l-għadd ta' konċentrazzjonijiet għandu jiżdied biex jiġi żgurat li jkun hemm numru adegwat ta' kulturi għall-analiżi (eż. għall-inqas tmien konċentrazzjonijiet analizzabbli). Għandhom jintużaw kulturi ta' kontroll negattivi duplikati (solvent).

Sustanzi gassużi jew volatili għandhom jiġu ttestjati b'metodi xierqa, bħal ma huma f'kontenituri magħluqa ta' kulturi (21) (22).

1.4.3.2. *Tkejjil ta' sopravivanza, vijabbiltà u frekwenza tal-mutazzjonijiet*

Fl-aħħar tal-perjodu ta' espożizzjoni, iċ-ċelluli jinhaslu u jitqiegħdu f'kulturi biex tiġi determinata s-sopravivenza u biex jippermettu l-espressjoni tal-fenotip mutanti. It-tkejjil taċ-ċitossicità billi tiġi determinata l-effiċjenza tal-klonazzjoni relattiva (sopravivenza) jew l-iżvilupp totali relattiv tal-kulturi normalment jinbeda wara l-perjodu ta' trattament.

Kull locus għandu hteġa ta' żmien minimu definit biex jippermetti l-espressjoni fenotipika kważi ottimali tal-mutanti ġodda li jkunu nholqu (HPRT u XPRT jehtieġu għall-inqas 6-8 ijiem, u TK għall-inqas jumejn). Iċ-Ċelloli jitkabbru f'medjum b'aġent(i) selettiv(i) jew mingħajru(hom) għad-determinazzjoni ta' l-għadd ta' mutanti u l-effiċjenza tal-klonazzjoni, rispettivament. It-tkejjil tal-vijabbiltà (li jintuza biex tiġi kalkolata l-frekwenza tal-mutazzjonijiet) jinbeda fl-aħħar tal-perjodu ta' espressjoni billi jitqiegħdu fuq bażi fil-medjum mhux selettiv.

Jekk is-sustanza tat-test tkun positività fit-test tal-L5178Y TK+/-, il-qies tal-kolonji għandu jiġi rilevat fuq għall-inqas wahda mill-kulturi tat-test (l-ogħla konċentrazzjoni positività) u fuq il-kontrolli negattivi u positivi. Jekk is-sustanza tat-test hi negattiva fit-test L5178Y TK+/-, il-qies tal-kolonji għandu jiġi rilevat fuq il-kontrolli negattivi u positivi. Fi studji li jużaw il-TK6TK+/-, għandu jitwettagħ ukoll il-qies tal-kolonji.

▼B**2. DATA****2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI**

L-informazzjoni għandha tinkludi d-determinazzjoni taċ-ċitossicità u l-vijabilità, l-għadd ta' kolonji, u l-frekwenzi ta' mutazzjonijiet għall-kulturi ta' trattament u ta' kontroll. Fil-każ ta' rispons positivi fit-test tal-L5178Y TK+/-, il-kolonji jingħaddu billi jintuza l-kriterju ta' kolonji żgħar u kbar f'għall-inqas konċentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test (l-ogħla konċentrazzjoni positiva) u fuq il-kontroll negattiv u positivi. In-natura molekulari u ċitogenetika ta' kolonji ta' mutazzjonijiet kemm kbar kif ukoll żgħar giet esplorata fid-dettall (23) (24). Fit-test tat-TK+/-, il-kolonji jingħaddu billi jintuza l-kriterju ta' tkabbir normali (kbar) u tkabbir bil-mod (żgħar) ta' kolonji. (25). L-Ċelloli ta' mutazzjoni li jkunu soġġetti l-aktar hsara ġenetika estensiva għandhom żminijiet ta' duplikazzjoni aktar prolongati u għalhekk jiffurmaw kolonji żgħar. Din il-hsara tipikament tinfirex fl-iskala mit-telf tal-gene intier għal devjazzjonijiet vizibbli karjotipikament tal-kromozomi. Il-presenza ta' kolonji żgħar mutanti giet assoċjata ma' kimiċi li jipproduċu alterazzjonijiet kbar fil-kromozomi (26). Ċelloli mutanti li jkunu ġew affettwati anqas serjament jikbru b'rati simili għal dawk ta' Ċelloli parentali u jiffurmaw kolonji kbar.

Għandu jingħata l-ammont ta' sopravivenza (effiċjenzi ta' klonazzjoni relattivi) jew l-iżvilupp totali relattiv. Il-frekwenza tal-mutazzjoni għandha tiġi espressa bħala n-numru ta' ċelluli mutanti paragonati man-numru ta' Ċelloli li jibqgħu hajjin.

Għandha tingħata l-informazzjoni dwar il-kulturi differenti. B'zieda ma' dan, għandu jingħata sommarju ta' l-informazzjoni kollha fil-forma ta' tabella.

Ma hemm l-ebda hteġa għall-verifika ta' rispons positivi ċar. Ir-riżultati dubbjużi għandhom jiġu ċċarati b'aktar testijiet preferibbilment billi jkun hemm modifika fil-kundizzjonijiet ta' l-esperiment. Riżultati negattivi għandhom jiġu konfermati fuq bażi ta' każ b'każ. F'dawk il-każijiet fejn il-konferma ta' riżultati negattivi mhijiex kkunsidrata bħala meħtieġa, għandha tingħata ġustifikazzjoni. Għandha tiġi kkunsidrata l-modifika tal-parametri ta' studju biex tkabbar il-medda tal-kundizzjonijiet valutati f'esperimenti li jsiru wara minhabba f'riżultati dubbjużi jew negattivi. Parametri ta' studju li jistgħu jiġu modifikati jinkludu l-intervall bejn id-dozi valutati u l-kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Hemm hafna kriterji biex jiġi stabbilit risultat positivi, bħal zieda relatata mal-konċentrazzjoni jew zieda riproduttiva fil-frekwenza ta' mutazzjonijiet. L-ewwel għandha titqies ir-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Jistgħu jintużaw metodi ta' statistika bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-test. Is-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal rispons positivi.

Sustanza ta' test li dwarha ir-riżultati ma jilhqx l-kriterji fuq imsem-mija hija meqjusa bħala mhux mutaġenika f'din is-sistema.

▼B

Għalkemm il-biċċa l-kbira ta' l-istudji jagħtu risulti ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni mogħtija ma tippermettix li jsir għidizzju definitiv dwar l-attività tas-sustanza tat-test. Ir-risultati jistgħu jibqgħu dubbjużi jew mhux ċari minkejja n-numru ta' drabi li jiġi ripetut l-esperiment.

Risultati pożittivi mit-test tal-mutazzjoni tal-ġene taċ-ċellula tal-mammiferi *in vitro* jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq mutazzjonijiet tal-ġene fiċ-Ċelloli ta' kulturi ta' mammiferi użati. Rispons porsittiv dwar il-konċentrazzjoni li huwa riprodubbli huwa ta' valur kbir. Risultati negattivi jindikaw li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloqx mutazzjonijiet tal-ġene fiċ-Ċelloli ta' kulturi ta' mammiferi użati.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1. **RAPPORT TAT-TEST**

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

Solvent/mezz:

- ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz;
- solubilità u stabbiltà tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Ċelloli:

- tip u għejun taċ-Ċelloli;
- numru ta' kulturi taċ-Ċelloli;
- numru ta' passaġġi, jekk ikun applikabbli;
- metodi għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-Ċelloli, jekk jkun applikabbli;
- assenza tal-mikoplasma.

Kundizzjonijiet tat-test:

- raġuni prinċipali għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet u għadd ta' kulturi inkluzi, eż. informazzjoni dwar ċitotossicità u limitazzjonijiet dwar solubilità, jekk ikunu disponibbli;
- komposizzjoni tal-medja, konċentrazzjoni CO₂;
- konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;
- volum tal-mezz u sustanza tat-test miżjuda;
- temperatura ta' l-inkubazzjoni;
- perjodu ta' inkubazzjoni;
- kemm idum it-trattament;
- densità taċ-ċellula waqt it-trattament;
- tip u komposizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika, inkluzi krierji ta' aċċettabilità;
- kontrolli pożittivi u negattivi;

▼B

- tul tal-perjodu ta' espressjoni (inkluz in-numru ta' ċelluli fiż-żriegħ, u skedi ta' subkulturi u alimentazzjoni, jekk ikun xieraq);
- aġenti selettivi;
- kriterji biex it-testijiet jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwi-voċi;
- metodi użati biex jingħadd in-numru ta' Ċelloli viabbli u mutanti;
- definizzjoni ta' kolonji li dwarhom jitqiesu l-qies u t-tip (inkluzi kriterji għal kolonji “żgħar” u “kbar”, kif xieraq).

Riżultati:

- sinjali ta' tossiċità;
- sinjali ta' preċipitazzjoni;
- informazzjoni dwar pH u l-osmolalià waqt l-espożizzjoni għas-sustanza tat-test, jekk ikun stabbilit;
- qies tal-kolonja jekk registrat għall-inqas għall-kontrolli negattivi u pożittivi;
- adegwatezza tal-laboratorju biex jiġu żvelati mutazzjonijiet f'kolonji żgħar bis sistema L5178Y TK+/-, fejn ikun xieraq;
- relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;
- analizi statistiċi, jekk ikun hemm;
- informazzjoni dwar kontroll fl-istess hin negattiv (solvent/mezz) u pożittiv;
- informazzjoni storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz) u pożittiv, bil-meded, mezzi u devjazzjonijiet standard;
- frekwenza ta' mutazzjonijiet.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindal, K.R. (eds.) (1987), Banbury Report 28; Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E.H.Y. and Mallin H.V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res. 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.

▼B

- (5) Aaron, C.S., and Stankowski, Jr. L.F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.* 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.* 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.* 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavourmin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.
- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK+/- -TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccolo, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome- Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31, pp. 347-364.

▼ B

- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis* 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine, Resistant (TFT+) Mutants of L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.* 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- – 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, pp. 609-614.

▼ M7

▼B**B.21. TEST TAT-TIBDILTAL-ĠENI F'ĊELLULIMAMMIFERI IN VITRO****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. TIFSIRA

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Sistemi tal-kultura taċ-Ċelloli mammiiferi jistgħu jintużaw għall-iskoperta ta' tibdil ikkaġunat minn sustanzi kimiċi. Linji taċ-Ċelloli li jintużaw hafna jinkludu L5178Y ċelluli tal-limfoma tal-ġrieden u l-linji CHO u V-79 taċ-Ċelloli ta' hamsters inizi. F'dawn il-linji taċ-ċelluli is-sistemi li jintużaw l-iktar jikkalkulaw it-tibdil f'thymidine kinase (TK), hypoxanthine guanine phosphorybosyl transferase (HPRT) [21] u NA/K ATPase loci. Is-sistemi ta' tibdil TK u HPRT isibu t-tibdil ta' bazi ta' pari, tibdil frameshift u thassir zghir; is-sistema NA/K issib biss it-tibdil ta' bazi ta' pari. Ċelloli nieqsin minn thymidine kinase (TK), minhabba t-tibdil 'l-quddiem TK – T K, huma rezistenti għall-bromodeossiuridina (BrdU), il-fluorodeossiuridina (FdU) jew it-trifluworotimidina (TFT) billi dawn l-antimetaboliti m'humiex inkorporati f'nukleotidi taċ-Ċelloli permezz tas-sistema ta' l-enzimi tas-salvataġġ thymidine kinase; in-nukleotidi mehtieġa għall-metabolizmu taċ-ċelluli jinkisbu biss minn sintesi de novo. Madankollu, fil-presenza ta' thymidine kinase BrdU, FdU jew TFT huma inkorporati fin-nukleotidi, bir-riżultat ta' l-inibizzjoni tal-metabolizmu taċ-Ċelloli u ċ-ċitotossicità. B'hekk iċ-Ċelloli mutanti jistgħu jipproliferaw fil-presenza ta' BrdU, FdU jew TFT filwaqt li ċ-Ċelloli normali, li fihom it-thymidine kinase, ma jistgħux. B'mod simili, iċ-Ċelloli nieqsin mill-HPRT jintgħazlu skond ir-reżistenza għal 8-ażagwanina (AG) jew 6-tiogwanina (TG). elluli b' NA/K ATPase alterati jintgħazlu skond ir-reżistenza għall-ouabain. Iċ-ċitotossicità hija determinata billi jitkejjel l-effett tal-materjal tat-test fuq il-kapaċitajiet għall-formazzjoni tal-kolonji (l-effiċjenza ta' l-ikklonjar) jew ir-rati tat-tkabbir tal-kulturi. Il-frekwenza tal-mutanti hija determinata billi jinzerghu numri magħrufa ta' Ċelloli f'mezz li fih l-aġent selettiv għall-iskoperta ta' Ċelloli mutanti, u f'mezz mingħajr l-aġent selettiv biex ikunu determinati ċ-Ċelloli sopravvienti. Wara perjodu ta' l-inkubazzjoni xieraq, il-kolonji jingħaddu. Il-frekwenzi tal-mutanti huma mkejja min-numru ta' kolonji ta' mutanti kkoreġuti għas-sopravivenza taċ-Ċelloli.

1.5. KRITERJI GħALL-KWALITÀ

Xejn

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Preparazzjonijiet

Ċelloli

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

▼B**M e z z**

Mezzi ta' kultura u kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa (eż. temperatura, vettura għall-kultura, konċentrazzjonijiet ta' CO₂ u umdità) għandhom jintużaw. Mezzi u sera għandhom jintgħażlu skond is-sistemi selettivi u t-tipi ta' Ċelloli użati fl-analizi.

S u s t a n z a t a t - t e s t

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

L - a t t i v a z z j o n i m e t a b o l i k a

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

Kundizzjonijiet tat-test**L - u ż u t a ' k o n t r o l l i n e g a t t i v i u p o ż i t t i v i**

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

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

— komposti attivi diretti:

— etilmetansulfonat;

— hycanthone;

— komposti attivi indiretti:

— 2-aċetilamminofluworin;

— 7,12-dimetilbenzantraċene;

— N-nitrosodimetilammina.

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

K o n ċ e n t r a z z j o n i j i e t t a ' l - e s p o ż i z z j o n i

Għandhom jintużaw bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test. Dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom johlqu effett tossiku skond il-konċentrazzjoni, bl-ogħla konċentrazzjoni li tohloq livell baxx ta' sopravivenza u bis-sopravivenza fil-konċentrazzjoni l-iktar baxxa li tkun kwazi l-istess daqs dik fil-kontroll negattiv. Sustanzi li relattivament ma jinhallux fl-ilma għandhom ikunu ttestjati sal-limitu tas-solubilità bl-użu ta' proċeduri xierqa. Għal sustanzi li m'humhiex tossiċi u li jinhallu faċilment fl-ilma, l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test għandha tkun determinata skond il-każ.

▼B**Proċedura**

In-numru ta' ċelluli użati għal kull kultura għandu jkun skond il-frekwenza ta' tibdil spontanju; gwida ġenerali hija l-użu ta' numru ta' ċelluli vijabbli li huwa għaxar darbiet l-invers tal-frekwenza tat-tibdil spontanju. Iċ-Ċelloli għandhom ikunu esposti għal perjodu ta' hin xieraq, fil-biċċa l-kbira tal-każijiet bejn sagħtejn u hames siegħat huwa effettiv. Ċelluli minghajr attività metabolika intrinsika suffiċjenti għandhom ikunu esposti għas-sustanza tat-test fil-preżenza u fl-assenza ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika xierqa. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, iċ-Ċelloli jinhaslu u jinħelsu mis-sustanza tat-test u jiġu kkultivati biex tkun determinata l-vijabilità u biex tkun tistà ssehh l-espressjoni tal-fenotip tal-mutant. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espressjoni, li għandu jkun biżżejjed biex jippermetti espressjoni fenotipika kważi ottima, iċ-Ċelloli jitkabbru fil-mezz b'agenti selettivi kif ukoll minghajr agenti selettivi għad-determinazzjoni tan-numri ta' mutanti u l-vijabilità. Ir-rizultati kollha jiġu ikkonfermati f'esperiment indipendenti.

2. ID-DATA

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

3. IR-RAPPURTAĠĠ**3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST**

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

- ir-razza użata, in-numru ta' kulturi ta' Ċelloli, il-metodi biex jinżammu l-kulturi taċ-Ċelloli;
- il-kundizzjonijiet tat-test: il-komposizzjoni tal-mezzi, il-konċentrazzjoni ta' CO₂, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, il-vettura użata, it-temperatura ta' l-inkubazzjoni, it-tul ta' l-inkubazzjoni, it-tul tal-perjodu għall-espressjoni (inkluż in-numru ta' Ċelloli mizrugħin u subkulturi u skedi ta' l-ikel, jekk xierqa), it-tul tat-trattament, id-densità taċ-ċelluli waqt it-trattament is-sistema għall-attivazzjoni metabolika, il-kundizzjonijiet tat-trattament: il-konċentrazzjoni ta' l-espożizzjoni, il-proċedura u t-tul tat-trattament, it-tip ta' sistema għall-attivazzjoni metabolika mammifera użata, kontrolli pożittivi u negattivi, l-agent selektiv użat; ir-raġuni għall-għażla tad-doża;
- il-metodu użat biex ikunu enumerati n-numri ta' Ċelloli vijabbli u mutanti;
- valutazzjoni statistika;
- id-diskussjoni tar-rizultati;
- l-interpretazzjoni tar-rizultati.

3.2. IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. REFERENZI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

▼B**B.22. TEST LETALI DOMINANTI TAL-MAMMALI GERRIEMA****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. TIFSIRA

Ara l-Introduzzjonii Ġenerali Parti B.

1.3. SUSTANZI GHAR-REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU GHAT-TEST

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

Ġeneralment, l-annimali tas-sess maskil huma esposti għall-kompost tat-test u mġhammra ma' annimali tas-sess femminili li huma verġni u li m'humiex trattati. Id-diversi stadji taċ-ċellula tal-mikrobu jistgħu ikunu ttestjati b'mod separat bl-użu ta' intervalli sekwenzali fit-tgħammir. Iz-zieda fl-impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp trattat diviż bin-numru ta' impjanti mejtin f'kull waħda tas-sess femminil fil-grupp tal-kontroll turi t-telfa ta' wara l-impjantazzjoni. It-telf ta' qabel l-impjantazzjoni tista' tkun stimata fuq il-bazi ta' l-għadd corpora lutea jew billi jitqabblu l-impjanti totali f'kull waħda tas-sess femminili fil-gruppi trattati u tal-kontroll. L-effett letali dominanti totali huwa t-total tat-telf ta' qabel u ta' wara l-impjantazzjoni. Il-kalkolu ta' l-effett letali dominanti totali huwa bbazat fuq it-tqabbil ta' impjanti ħajjin f'kull waħda mis-sess femminili fil-grupp tat-test ma' l-impjanti ħajjin f'kull waħda mis-sess femminili fil-grupp tal-kontroll. Tnaqqis fin-numru ta' impjanti f'certi intervalli jista' jkun ir-riżultat tal-qtil ta' Ċelloli (jigifieri spermatoċiti u/jew spermatogonji).

1.5. KRITERJI TAL-KWALITÀ

Xejn

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU GHAT-TEST

Preparazzjonijiet

Meta possibbli, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu mahlula jew sospizi f'soluzzjoni mielħa isotonika. Kimiċi li ma' jinhallux fl-ilma jistgħu ikunu mahlula jew sospizi f'vetturi xierqa. Il-vettura uzata m'għandhiex tfixxkel il-kimika tat-test u lanqas m'għandha tipproduċi effetti tossiċi. Preparazzjonijiet ġodda tal-kimika tat-test għandhom ikunu uzati.

▼B

Kundizzjonijiet tat-test

Rotta ta' l-amministrazzjoni

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

Annimali sperimentali

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

In-numru u s-sess

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

L-użu ta' kontrolli negattivi u pożittivi

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

Livell tad-doża

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

Test tal-limitu

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

Proċedura

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

Annimali individwali tas-sess maskil huma mghammrin sekwenzjalment ma' waħda jew żewġ annimali tas-sess femminili li huma vergni u li m'humiex trattati, f'intervalli xierqa wara t-trattament. Annimali femminili għandhom jithallew ma' daww maskili għall-inqas għat-tul ta' ciklu estrus wieħed jew sakemm isehh it-tghammir kif determinat bil-preżenza ta' l-isperma fil-vaġina jew bil-preżenza ta' tapp vaġinali.

▼B

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

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

2. ID-DATA

Id-data għandha tkun f'forma ta' tabelli biex turi n-numru ta' annimali maskili, in-numru ta' femminili tqal, u n-numru ta' annimali femminili li m'humhiex tqal. Ir-riżultati ta' kull tghammir, inkluża l-identità ta' kull animal maskil u femminili. Għandhom ikunu rrapportati b'mod individwali. Għal kull animal femminili, il-gimgha tat-tghammir, il-livell tad-doża li nġhatat lill-annimal maskil, il-frekwenza ta' impjanti hajjin u ta' impjanti mejtin għandhom ikunu imnizzla.

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

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

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

3. IR-RAPPORTAĠĠ

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

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

- l-ispeċi, ir-razza, iż-żmien u l-piż ta' l-annimali użati, in-numru ta' annimali ta' kull sess fil-gruppi ta' sperimentazzjoni u kontroll;
- is-sustanza tat-test, il-vettura, il-livelli tad-doża ttestjati u r-raġuni għall-għażla tad-doża, kontrolli pożittivi u negattivi, data dwar it-tossicità;
- ir-rotta u l-iskeda tat-trattament;
- l-iskeda tat-tghammir;
- il-metodu użat biex ikun determinat li sar it-tghammir;
- il-hin tas-saġrifċju;
- il-kriterji biex jingħaddu letali dominanti;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-risposta, jekk tapplika;

▼B

- valutazzjoni statistika;
- id-diskussjoni tar-riżultati;
- l-interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. REFERENZI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

▼B**B.23. TEST DWAR ANORMALITÀ FIL-KROMOŽOMI SPERMATOGONI TAL-MAMMIFERI****1. METODU**

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 483, Test dwar Anormalità fil-Kromożomi Spermatogoni tal-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

L-ghan tat-test *in vivo* dwar anormalitajiet fil-kromożomi spermatogoni tal-mammiferi huwa biex jiġu identifikati sustanzi li jikkawżaw anormalitajiet strutturali fil-kromożomi fiċ-Ċelloli spermatogoni tal-mammiferi (1) (2) (3) (4) (5). Anormalitajiet strutturali jistgħu jkunu ta' żewġ tipi, kromożomi jew kromatidi. Fil-maġġoranza ta' mutageni kimiċi, anormalitajiet imġieghela huma tat-tip kromatidu, iżda jirrikorru wkoll anormalitajiet tat-tip ta' kromożomi. Dan il-metodu mhux intiz biex jitkejlu l-anormalitajiet numeriċi u ma jintużax bħala rutina għal dak il-ghan. Mutazzjonijiet fil-kromożomi u għrajiet relatati huma l-kawża ta' hafna mard genetiku fil-bniedem.

Dan it-test ikejjel l-għrajiet tal-kromożomi fiċ-Ċelloli spermatogoni u, għalhekk, hu mahsub li jipprevedi l-mutazzjonijiet ġenetiċi fiċ-ċelluli ġerminali.

Annimali gerriema jintużaw generalment f'dan it-test. Dan it-test citogenetiku jiżvela anormalitajiet fil-kromożomi f'mitosi spermatogoni. Ċelloli oħra mmirati mhumix l-oġġett ta' dan il-metodu.

Sabiex jiġu żvelati anormalitajiet tat-tip kromatid f'Ċelloli spermatogoni, għandha tiġi eżaminata l-ewwel diviżjoni taċ-ċellula mitotika qabel ma jintilfu dawn il-leżjonijiet f'diviżjonijiet sussegwenti taċ-Ċelloli. Tista' tinkiseb informazzjoni addizzjonali minn Ċelloli spermatogoni trattati bl-analisi tal-kromożomi mejotici għal anormalitajiet tat-tip tal-kromożomi fil-metafazi tad-dijakinesis I meta ċ-Ċelloli ttrattati jsiru spermatociti.

Dan it-test *in vivo* huwa intiz biex jinvestiga jekk mutageni ta' Ċelloli somatiċi jkunux attivi f'Ċelloli ġerminali. B'zieda ma' dan, it-test spermatogonu huwa rilevanti fil-valutazzjoni ta' perikli mutageniċi għax jippermetti l-kunsiderazzjoni ta' fatturi ta' metabolizmu *in vivo*, farmakokinetika u proċessi ta' tiswija ta' DNA.

Jeżisti numru ta' ġenerazzjonijiet ta' spermatogoni fit-testikoli bi spettru ta' sensitività għat-trattament kimiku. Għalhekk, l-anormalitajiet żvelati jirrappreżentaw rispons medju ta' popolazzjonijiet ta' Ċelloli spermatogoni ttrattati, bi predominanza ta' Ċelloli spermatogoni differenzati li jkunu aktar numerużi. Skond il-posizzjoni tagħhom fit-testikoli, ġenerazzjonijiet differenti ta' spermatogoni jistgħu jew ma jistgħux ikunu esposti għal ċirkolazzjoni ġenerali, minhabba fil-barriera fiżika u fiżjoloġika ta' ċelluli Sertoli u l-barriera ematotestikolari.

Jekk hemm xiedha li s-sustanza tat-test, jew metabolit reattiv, ma jwasslux għat-tessut immirat, mhux xieraq li jintuża dan it-test.

Ara ukoll Introduzzjoni ġenerali Taqsima B.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Anormalità tat-tip kromatidu: hsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur ta' kromatidi singoli jew ksur u għaqda mill-gdid bejn kromatidi.

Anormalità tat-tip tal-kromożomi: hsara strutturali fil-kromożomi espressa bħala ksur, jew ksur u għaqda mill-gdid, taż-żewġ kromatidi f'sit identiku.

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

Anormalità numerika: bidla fin-numru ta' kromożomi min-numru karatteristiku normali ta' Celloli utilizzati.

Poliploidji: multiplu tan-numru aploidu ta' kromożomi (n) minbarra n -numru diploidu (jiġifieri $3n$, $4n$, eċċetera).

Anormalità strutturali: bidla fl-istruttura tal-kromożomi li wiehed jinduna biha bl-eżami mikroskopiku ta' l-istadju metafaziku tad-diviżjoni ta' ċelluli, osservati bħala tħassir u biċċiet, bidliet minn ġewwa u bidliet bejniethom.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Annimali huma esposti għas-sustanza tat-test b'rotta xierqa ta' espożizzjoni u huma sakrifikati f'hinijiet xierqa wara t-trattament. Qabel ma jiġu sakrifikati, l-annimali huma ttrattati b'sustanza li twaqqaf il-metafażi (eż. kolċicina jew Colcemid®). Imbagħad isiru preparazzjonijiet ta' kromożomi miċ-Celloli germinali u jiġu mtebbgħin, u ċ-Celloli metafaziċi jiġu analizzati għal anormalitajiet fil-kromożomi.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. Preparazzjonijiet

1.4.1.1. *Selezzjoni ta' l-ispeċi ta' l-annimali*

Normalment jintużaw ħamsters ċiniżi u ġrieden. Madankollu, jistgħu jintużaw l-annimali maskili ta' speċi oħra ta' mammiferi xierqa. Għandhom jintużaw razzi, li komunement jintużaw fil-laboratorji, ta' annimali adulti b'saħħithom u żgħar. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali għandha tkun minima u ma teċċedix $\pm 20\%$ tal-medja tal-piż.

1.4.1.2. *Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu*

Għandhom japplikaw il-kundizzjonijiet ġenerali msemmija fl-Intro-duzzjoni ġenerali għat-Taqsima B iżda l-mira dwar l-umdità għandha tkun 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Annimali adulti żgħar u b'saħħithom jiġu assenjati mingħajr skema għall-gruppi ta' kontroll u trattament. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li jiġu minimizzati effetti possibbli li jirri-żultaw minn kif jitqiegħdu l-gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati wiehed wiehed. L-annimali jiġu akklimatizzati għall-kundizzjoni-jiet tal-laboratorju għall-inqas għal hamest ijiem qabel ma jibda l-istudju.

▼B

1.4.1.4. *Preparazzjoni tad-doži*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospizi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament ta' l-annimali. Sustanzi likwidi tat-test jistghu jiġu ttrattati direttament jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet godda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbiltà ma turix laċċettabbiltà tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Is-solvent/mezz ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doża użata, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanza tat-test. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok daww l-aktar magħrufa, l-inkluzjoni tagħhom għandha tkun appoggata b'informazzjoni li tindika l-kompatibilità tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż.

1.4.2.2. *Kontrolli*

Għandhom jiġu inkluzi f'kull test kontrolli pożittivi u negattivi fl-istess hin (solvent/mezz). Hlief għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod bħall-annimali fil-grupp ta' trattament.

Il-kontrolli pożittivi għandhom jipproduċu anormalitajiet strutturali fil-kromozomi *in vivo* fiċ-Ċelloli spermatogoni meta jiġu somministrati fl-livelli ta' espożizzjoni li huma mistennija li jagħtu zieda li tkun tidher fuq l-isfond.

Doži ta' kontrolli pożittivi għandhom jingħazlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatament l-identità tad-dijapożittivi kodifikati lil min jaqrahom. Huwa aċċettat li l-kontrolli pożittivi jiġi somministrat minn rotta differenti minn dik tas-sustanza tat-test u jittiehed kampjun darba wahda biss. Barra minn dan, jista' jiġi kkunsidrat l-użu ta' kimiċi ta' kontrolli pożittivi relatati mal-klassi ta' kimiċi, meta dawn ikunu disponibbli. Eżempji ta' sustanzi ta' kontrolli pożittivi jinkludu:

Sustanza	Nru CAS	Nru EINECS
Ċiklofosfamid	50-18-0	200-015-4
Monojdrat taċ-ċiklofosfamid	6055-19-2	
Ċiklohessilamina	108-91-8	203-629-0
Mitomiċin-C	50-07-7	200-008-6
Akrilamid monomeriku	79-06-1	201-173-7
Trietilenemelamina	51-18-3	200-083-5

Il-kontrolli negattivi, trattati biss bis-solvent jew bil-mezz, u mod ieħor trattati bl-istess mod bħall-gruppi tat-trattament, għandhom jiġu inkluzi għal kull perjodu ta' teħid ta' kampjuni, sakemm ma jkunx disponibbli varjabbiltà aċċettabbli bejn l-annimali u frekwenzi ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromozomi mill-informazzjoni storika tal-kontroll. Barra minn dan, għandhom jintużaw ukoll kontrolli mhux trattati sakemm ma jkunx hemm informazzjoni ta' kontrolli pubblikata u storika li turi li jkun hemm effetti ta' ħsara u mutaġeniċi bl-użu tas-solvent/mezz magħżul.

▼B**1.5. PROCEDURA****1.5.1. Numru ta' l-annimali**

Kull grupp ta' trattament u ta' kontroll għandu jinkludi fih għall-inqas hames annimali maskili analizzabbli

1.5.2. Skeda tat-trattament

Is-sustanzi tat-test huma preferibbilment somministrati darba jew tnejn (jiġifieri bħala trattament singolu jew żewġ trattamenti). Is-sustanzi tat-test jistgħu wkoll jiġu somministrati bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattamenti fl-istess gurnata separati b'mhux aktar minn ftit sigħat, biex tiġi faċilitata s-somministrazzjoni ta' volum qawwi ta' materjal. Reġimi ta' dozi oħra għandhom ikunu ġustifikati xjentifikament.

Fil-grupp ta' l-oghla doża jittiehdu żewġ kampjuni wara t-trattament. Ladarba l-kinetika taċ-ċikli taċ-Celloli tista' tiġi influwenzata bis-sustanza tat-test, jintużaw hinijiet għat-tehid ta' kampjuni wiehed bikri u l-iehor tard madwar 24 u 48 siegħa wara t-trattament. Għal dozi oghla mill-l-oghla doża għandu jittiehed zin ta' tehid ta' kampjun ta' 24 siegħa jew ta' 1,5 it-tul taċ-ċiklu ta' ċellula wara t-trattament, sakemm ma jkunx magħruf li jkun hemm hin ta' tehid ta' kampjun ieħor aktar xieraq għall-iżvelar ta' l-effetti.

B'zieda ma' dan, jistgħu jintużaw hinijiet ta' tehid ta' kampjun oħra. Per eżempju fil-każ ta' kimiċi li jistgħu jikkawżaw telf ta' kromozomi, jew jistgħu jkollhom effetti indipendenti mill-fażi S, kull wiehed mill-hinijiet ta' tehid ta' kampjuni huwa xieraq.

Il-konvenjenza ta' skeda ta' trattament ripetut għandha tiġi identifikata fuq bażi ta' każ b'każ. Wara skeda ta' trattament ripetut l-annimali għandhom imbagħad jiġu sakrifikati 24 siegħa (1,5 tul ta' ċiklu ta' ċellula) wara l-aħħar trattament. Jistgħu jintużaw hinijiet ta' tehid ta' kampjun addizzjonali meta jkun xieraq.

Qabel is-sagrifiċċju, l-annimali huma injettati intraperitonealment b'doża xierqa ta' sustanza li twaqqaf l-metafażi (eż. Colcemid® jew kolċicina). Wara dan, jittiehed kampjun mill-annimali f'intervalli xierqa. Għall-ġrieden dan l-intervall huwa ta' madwar 3-5 siegħat; għal Hamsters ċiniżi dan l-intervall huwa ta' madwar 4-5 siegħat.

1.5.3. Livelli ta' doża

Jekk jitwettaq studju biex tiġi skoperta l-medda għax ma jkunx hemm disponibbli informazzjoni xierqa, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, jintużaw l-istess speċi, razza, sess u metodu ta' trattament li għandhom jintużaw fl-istudju prinċipali (7). Jekk ikun hemm tossiċità, jintużaw tliet livelli ta' doża għall-ewwel perjodu ta' tehid ta' kampjuni. Dawn il-livelli ta' doża għandhom jkopru medda mill-massimu għal ftit jew l-ebda tossiċità. L-oghla doża hija mfissra bħala s-sinjali ta' tossiċità li jipproduċu d-dozi hekk li livelli oghla tad-doża, bbażati fuq l-istess reġim ta' dożaġġ, huma mistennija li jikkawżaw il-mewt.

▼B

Is-sustanzi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dożi baxxi mhux tossiċi (bhal ma huma ormoni u nitroġeni) jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' l-issettjar tad-dożi u għandhom jiġu valutati fuq bażi ta' każ b'każ. L-ogħla doża tista' ukoll tfixxer id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fiċ-Ċelloli spermatogoni (eż. riduzzjoni fil-paragun bejn mitosi spermatogoni u l-ewwel jew itieni metafażi mejoṡika; din ir-riduzzjoni ma għandhiex teċċedi 50 %).

1.5.4. Test tal-limitu

Jekk test ta' doża waħda ta' livell ta' għall-inqas 2 000 mg/kg piż tal-ġisem/ġurnata meta jitwettaq trattament wiehed, jew bħala żewġ trattamenti fl-istess ġurnata, ma jipproduċix effetti tossiċi li wiehed jinduna bihom, u jekk ma tkun mistennija l-ġenotossicità fuq il-bażi ta' l-informazzjoni minn sustanzi strutturalment relatati, allura ma jitqiesx li jkun neċessarju li jsir studju komplet bl-użu ta' tliet livelli ta' dożaġġ. L-espożizzjoni umana mistennija tista' tindika l-ħtieġa ta' livell ogħla ta' doża li għandu jintuża fit-test tal-limitu.

1.5.5. Somministrazzjoni ta' dożi

Normalment is-sustanza tat-test tiġi somministrata b'gavage billi jintuża tubu għall-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni, jew bl-injezzjoni intraperitoneali. Fejn ikunu ġustifikati, jistgħu jiġu aċċettati rotot oħra ta' espożizzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jiġi somministrat b'gavage jew b'injezzjoni f'ħin wiehed jiddependi fuq il-qies ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 2 ml/100g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dawn għandu jkun ġustifikat. Hlief fil-każ ta' sustanzi li jirritaw jew korrożivi li normalment juru effetti aggravati b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbilita fil-volum tat-test għandha titnaqqas bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fuq il-livelli kollha tad-doża.

1.5.6. Preparazzjoni tal-kromożomi

Minnufih wara s-sagrifiċċju, jinkisbu s-sospensjonijiet taċ-Ċelloli minn test wiehed jew miż-żewġ testijiet, esposti għal soluzzjoni ipotonika u ffixxati. Iċ-Ċelloli imbagħad jinfirxu fuq diġapozitivi u jingħataw kulur.

1.5.7. Analizi

Għandhom jiġu analizzati għall-inqas 100 metafażi mferxin sew għal kull annimal (jiġifieri minimu ta' 500 metafażi kull grupp). Dan in-numru jista' jitnaqqas meta jiġi nnotat għadd kbir ta' anormalitajiet. Id-diġapozitivi kollha, inklużi dawk ta' kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati indipendentement qabel l-analizi mikroskopika. Billi l-proċeduri ta' fissazzjoni jirriżultaw ħafna drabi fil-ksur ta' għadd ta' metafażi bit-telf ta' kromożomi, iċ-Ċelloli li jingħaddu għandu għalhekk ikun fihom numru ta' ċentromeri ugwali għan-numru $2n \pm 2$.

2. DATA

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

L-informazzjoni dwar annimali individwali għandha tingħata f'forma ta' tabella. L-unità sperimentali hija l-annimal. Għal kull annimal għandhom jiġu valutati n-numru ta' Ċelloli b'anormalitajiet strutturali tal-kromożomi u in-numru ta' anormalitajiet fil-kromożomi f'kull ċellula. Għandhom jiġu elenkati t-tipi differenti ta' anormalitajiet strutturali fil-kromożomi bl-għadd u l-frekwenzi tagħhom għal gruppi ta' trattament u ta' kontroll. Il-vojt jiġi reġisttrat separatament u jsir rapport dwaru iżda ġeneralment ma jiġix inkluż fil-frekwenza totali ta' l-anormalità.

▼B

Jekk tiġi osservata l-mitosi kif ukoll il-mejosi, il-paragun bejn mitosi spermatogoni u l-ewwel u t-tieni metafażi mejotiċi għandu jiġi determinat bħala misura ta' ċitossicità għall-annimali kollha trattati u ta' kontroll negattiv f'kampjun totali ta' 100 ċellula divi-sibbli għal kull annimal biex jiġi stabbilit l-effett ċitotossiku possibbli. Jekk tiġi osservata mitosi biss, l-indiċi tal-mitosi għandu jiġi determinat f'għall-inqas 1 000 ċellula għal kull annimal.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Hemm hafna kriterji biex jiġi stabbilit riżultat pożittiv, bhal ma hi żieda relatata mad-doża fl-ghadd relattiv ta' Ċelloli b'anormalitajiet fil-kromozomi jew żieda ċara fin-numru ta' Ċelloli b'anormalitajiet fi grupp singolu ta' trattament fi żmien singolu ta' teħid ta' kamp-juni. L-ewwel għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika tar-riżultati. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet (8), jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. L-importanza ta' l-istatistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur determinanti għal riżultat pożittiv. Riżultati ekwivoċi għandhom jiġu ċċarati b'testijiet ulter-juri preferibbilment billi tintuża modifika tal-kundizzjonijiet ta' l-esperiment.

Sustanza ta' test li dwarha r-riżultati ma jilhqx il-kriterji fuq imsemmija titqies bħala mhux mutagenika f'dan it-test.

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tipper-mettix li jsir ġudizzju definitiv dwar l-attività ta' sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruhu l-esperiment.

Ir-riżultati pożittivi minn test *in vivo* ta' anormalitajiet fil-kromo-zomi spermatogoni jindikaw li s-sustanza tat-test toħloq anormali-tajiet strutturali fiċ-Ċelloli ġerminali ta' l-ispeċi ttestjata. Ir-riżultati negattivi jindikaw li, taħt il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma toħloq anormalitajiet fiċ-Ċelloli ġerminali ta' l-ispeċi ttest-jata.

Għandha tiġi diskussa l-probabilità li s-sustanza tat-test jew il-metaboliti tagħha jilhqx t-tessut immirat.

3. RAPPORTAĠĠ

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

Solvent/mezz:

— ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz;

— solubilità u stabbilità tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Annimali ttestjati:

— speċi/razza użati;

— numru u età ta' l-annimali;

— għejjun, kundizzjonijiet dwar fejn jinżammu, dieta, eċċ.;

— piż individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test, inkluża l-medda ta' piż tal-ġisem, mezzi u devjazzjoni standard għal kull grupp.

▼B

Kundizzjonijiet tat-test:

- informazzjoni mill-istudju dwar il-medda, jekk ikun sar;
- raġuni prinċipali għall-ghazla ta' livell tad-doża;
- raġuni prinċipali dwar ir-rotta ta' somministrazzjoni;
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test;
- dettalji dwar is-somministrazzjoni tas-sustanza tat-test;
- raġuni prinċipali għall-hinijiet tas-sagrifiċju;
- konverżjoni mill-konċentrazzjoni (ppm) tas-sustanza tat-test dieta/ilma għax-xorb għad doża attwali (mg/kg piz tal-gisem/jum) jekk tkun applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma;
- deskrizzjoni dettaljata dwar l-iskedi ta' trattament u tehid ta' kampjuni;
- metodi biex titqies it-tossiċità;
- identità tas-sustanza li twaqqaf il-metafażi, il-konċentrazzjoni tagħha u kemm idum it-trattament;
- metodi tal-preparazzjoni tad-dijapożitivi;
- kriterji għall-ghadd ta' anormalitajiet;
- numru ta' Ċelloli analizzati kull annimal;
- kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pozittivi, negattivi jew ekwi-voċi.

Riżultati:

- sinjali ta' tossiċità;
- indici mitotiku;
- paragun bejn mitosi spermatogoni u l-ewwel u t-tieni metafasi mejotiċi;
- tip u numru ta' anormalitajiet, mogħtija separatament għal kull annimal;
- numru totali ta' anormalitajiet għal kull grupp;
- relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn ikun possibbli;
- analiżi statistiċi, jekk ikun hemm;
- informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin negattiv;
- informazzjoni storika dwar kontroll negattiv (solvent/mezz), bil-meded, mezz u devjazzjonijiet standard;
- informazzjoni dwar kontroll fl-istess ħin pozittiv;
- bidliet fil-plojdi, jekk jidhru.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunklużjonijiet.

▼ **B**

4.

REFERENZI

- (1) Adler, I. D., (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, (ed.) S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.
- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207-209.
- (6) Adler, I. D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313-318.
- (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.
- (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼ **M7**

▼B**B.25. IT-TRASLOKAZZJONI TAL-ĠRIEDEN LI TITTIEHED****1. METODU****1.1 INTRODUZZJONI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2 DEFINIZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3 IS-SOSTANZI TAR-REFERENZA

Xejn.

1.4 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-test tat-traslokazzjoni tal-ġrieden li tittiehed jiskopri it-tibdiliet strutturali u numeriċi fil-kromożomi fiċ-ċelloli mammarji tal-mikrob kif rkuprati fil-wild ta' l-annimali ta' l-ewwel generazzjoni. It-tipi ta' tibdiliet fil-kromożomi skoperti huma traslokazzjonijiet reċiproċi u, jekk il-wild femminili jkunu inkluzi, it-telf tal-kromożom-X. Dawk li jgħorru t-traslokazzjonijiet u il-femminili-XO juru fertilità mnaqqa li hija użata biex jintgħażel il-wild ta' l-annimali F₁ għall-analiżi ċitogenetika. L-isterilità kompleta hija kkawżata minn ċerti tipi ta' traslokazzjonijiet (X-autosome u tat-tip c-t). It-traslokazzjonijiet huma osservati ċitogenetikament fiċ-ċelloli mejotici fil-metafażi tad-dijakinesi I ta' l-individwi maskili, jew irġiel F₁ jew il-wild irġiel tan-nisa F₁. In-nisa-XO huma ċitogenetikament identifikati mill-presenza ta' 39 kromożomi biss fil-mitosi tal-mudullun ta' l-ghadma.

1.5 IL-KRITERJU TAL-KWALITÀ

Xejn.

1.6 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Il-preparazzjonijiet

Il-kimiċi tat-testijiet huma mahlulin fl-ilma tal-melħ isotoniku. Jekk ikunu insolubbli dawn jiġu mahlula jew sospizi fil-vetturi adattati. Is-soluzzjonijiet ippreparati friski tal-kompost tat-test jiġu użati. Jekk vettura hija użata biex ikun faċilitat id-dosaġġ, dan m'għandu ifixxkel il-kompost tat-test jew jipproduċi effetti tossiċi.

Il-mod ta' l-amministrazzjoni

Il-modi ta' l-amministrazzjoni huma normalment intubazzjoni orali jew injezzjoni fil-peritonew. Il-modi l-oħra ta' l-amministrazzjoni jistgħu jkunu adattati.

L-annimali ta' l-esperimentazzjoni

Biex ikunu faċilitat it-tagħmir u l-verifikazzjonijiet ċitologika dawn l-esperimenti huma magħmula fuq il-ġrieden. L-ebda razza ta' ġuridin m'hija mehtieġa. Madanakollu, il-medja tad-daqs tal-boton tar-razza għandu jkun aktar minn tmienja u għandu jkun relattivament kostanti.

Annimali b'saħħithom u maturi sesswalment huma użati.

▼B**In-numru ta' l-animali**

In-numru ta' l-animali neċessarju jiddependi fuq il-frekwenza spontanja tat-traslokazzjoni u r-rata minima ta' induzzjoni mehtieġa għal riżultati pożittivi.

It-test huwa normalment magħmul permezz ta' analizi tal-wild irġiel F_1 . Minn ta' l-anqas 500 wild irġiel F_1 għandhom ikunu ttestjati għal kull grupp ta' doza. Jekk il-wild nisa F_1 ikunu nkluzi, 300 raġel u 300 mara huma mehtieġa.

L-użu tal-kontrolli negattivi u pożittivi

Id-data adattata tal-kontroll, miksuba mill-kontroll konkorrenti u storiku għandha tkun disponibbli. Meta' r-riżultati pożittivi aċċettabbli tal-kontroll huma disponibbli mill-esperimenti magħmula riċentement fl-istess laboratorju dawn ir-riżultati jistgħu jkunu użati minflok il-kontroll konkorrenti pożittivi.

Il-livelli tad-doża

Il-livell wiehed tad-doża huwa ttestjat, normalment l-ghola doża assoċjata mal-produzzjoni ta' l-effetti tossiċi minimi, iżda mingħajr ma' taffetwa l-aġir riproduttiv jew is-sopravivenza. Biex tkun stabbilita relazzjoni doża/rispons żewġ dozi addizzjonali aktar baxxi huma mehtieġa. Għall-kimiċi li mhumex tossiċi l-espożizzjoni għad-doża massima prattikabbli għandha tkun użata.

Il-proċedura**It-trattament u t-tgħammir**

Żewġ ċedoli ta' trattament huma disponibbli. L-amministrazzjoni waħda tas-sostanzi tat-test hija dik l-aktar użata. L-amministrazzjoni tas-sostanza tat-test fuq sebat ijiem fil-ġimgħa għal 35 ġurnata tista' wkoll tkun użata. In-numri ta' tgħammiriet wara t-trattament huma kontrollati miċ-ċedola tat-trattament u għandu jiżgura li kull stadju taċ-ċellola tal-mikrobu trattata jkun mehud kampjun minnu. Fl-ahhar tal-perjodu tat-tgħammir in-nisa jiġu msakkra f'gaġeġ separati. Meta' n-nisa jwelledu, id-data, id-daqs tal-boton u s-sess tal-wild għandhom ikunu rekordjati. L-ulied irġiel kollha jinfatmu u l-ulied nisa huma mormija sakemm dawn ma jkunux inkluzi fl-esperiment.

L-ittestjar għat-traslokazzjonijiet eterożigożita'

Wiehed miż-żewġ metodi possibbli huwa użat:

- L-ittestjar tal-fertilità ta' l-ulied F_1 u l-verifikazzjoni sussegwenti ta' daww li possibbilment iġorru t-traslokazzjoni bl-analizi ċitogenetika;
- L-analizi ċitogenetika ta' l-ulied irġiel F_1 kollha mingħajr għażla minn qabel bl-ittestjar tal-fertilità.

(a) L-ittestjar tal-fertilità

Il-fertilità mnaqqsa ta' l-individwu F_1 tista' tkun stabbilita bl-osservazzjoni tad-daqs tal-boton u/jew l-analizi tal-kontenut ta' l-utru tas-sieħba nisa.

Il-kriterji biex tkun determinata l-fertilità normali u mnaqqsa għandhom ikunu stabbiliti għar-razza tal-ġrieden użata.

▼B

L-osservazzjoni tad-daqs tal-boton: L-irġiel F_1 li għandhom ikunu ttestjati għandhom ikunu maqfula go gageg individwalment man-nisa jew mill-istess esperiment jew mill-kolonja. Il-gageg huma spezzjonati kuljum mit-18 il-gurnata wara t-tghammir. Id-daqs tal-boton u s-sess ta' l-ulied F_2 huma rrekordjati mal-wild u l-botnijiet huma mormija minn dak in-nhar 'l hemm. Jekk l-ulied nisa F_1 ikunu ttestjati l-ulied F_2 tal-botnijiet iż-żgħar huma miżmuma għall-aktar testijiet. Dawk li jgħorru t-traslokazzjoni u huma nisa huma verifikati bl-analiżi ċitogenetika għal traslokazzjoni fi kwalunkwe mill-ulied irġiel tagħhom. In-nisa-XO huma magħrufa mill-bidla fir-rata mqabbla tas-sess fost l-ulied tagħhom minn 1:1 sa 1:2 irġiel vs. nisa. Fil-proċedura sekwenzali, l-annimali normali F_1 huma eliminati minn aktar testijiet jekk l-ewwel boton F_2 jilhaq jew jaqbez il-valur normali predeterminat, altrimenti boton it-tieni jew it-tielet boton F_2 huwa osservat.

L-annimali F_1 li ma jistgħux ikunu klassifikati bħala normali wara l-osservazzjoni ta' sa tlett botnijiet F_2 jiġu jew ittestjati aktar bl-analiżi tal-kontenut ta' l-utru tas-sieħba nisa jew direttament soġġetti għall-analiżi ċitogenetika.

L-analiżi tal-kontenut ta' l-utru: It-tnaqqis fid-daqs tal-boton ta' dawk li jgħorru t-traslokazzjoni huwa minhabba għall-mewt embrijonika u għalhekk numru kbir ta' impjanti mejta huwa indikattiv tal-preżenza tat-traslokazzjoni fl-annimal li qed jiġi ttestjat. L-irġiel F_1 li għandhom ikunu ttestjati għandhom ikunu mghammra ma' tnejn jew tlett nisa kull wieħed. Il-konċepiment huwa stabbilit bl-ispezzjoni ta' kuljum għall-plakek tal-vagina kull filgħodu. In-nisa huma sakrifikati minn 14 sa 16 il-jum wara u l-impjanti hajjin u mejtin fl-utri tagħhom huma rekordjati.

(b) L-analiżi ċitogenetika

Il-preparazzjonijiet tat-test huma magħmula bit-teknika tat-tnixxif bl-arja. Dawk li jgħorru t-traslokazzjoni huma identifikati bil-presenza ta' konfigurazzjonijiet multivalenti fil-metfazi dijakinesi I fl-ispermatoċiti primarji. L-osservazzjoni ta' mill-anqas żewġ ċelloli bl-assoċjazzjoni multivalenti tikkostitwixxi l-evidenza mehtieġa li l-annimal ittestjat huwa dak li jgħorr it-traslokazzjoni.

Jekk l-ebda selezzjoni ta' tghammir ma tkun saret l-irġiel F_1 kollha huma spezzjonati ċitogenetikament. Il-minimu ta' 25 ċellola tal-metafażi dijakinezi I għal kull raġel għandu jkun milhuq mikroskopikament. L-eżaminazzjoni tal-metafażi mitotika, fl-ispermatoġonia jew l-għadma tal-mudullun, hija mehtieġa fl-irġiel F_1 bit-testikoli żgħar u t-tnaqqis mehtiku qabel id-djakinezi jew mis-sospetti tan-nisa F_1 . Il-presenza ta' kromożoma twila u/jew qasira b'mod abnormali f'kull wahda mill-10 ċelloli hija evidenza għat-traslokazzjoni partikolari ta' l-irġiel sterili (tip c-t). Xi ftit traslokazzjonijiet X-awtosomatiċi li jikkawżaw l-isterilità fl-irġiel jistgħu biss ikunu identifikati bl-analiżi tal-gruppi tal-kromożomi mitotici. Il-presenza ta' 39 kromożomi fl-10 mitozi kollha hija evidenza għall-kundizzjoni XO f'mara.

2.

ID-DATA

Id-data hija prezentata fil-forma ta' tabelli.

Il-medja tad-daqs tal-boton u r-rata tas-sess mit-tagħmir tal-ġenituri fit-twelid u l-ftiem huma rappurtati għal kull intervall ta' tghammir.

▼B

Għall-assessjar tal-fertilità ta' l-animali F_1 , il-medja tad-daqs tal-boton ta' tghammiriet kollha normali u d-daqsijiet tal-botnijiet individwali ta' daww li jgħorru t-traslokazzjoni F_1 huma preżentati. Għall-analiżi tal-kontenut ta' l-utru, il-medja tan-numru ta' l-impjanti ħajjin u mejtin ta' tghammiriet normali u n-numri individwali ta' l-impjanti ħajjin u mejtin għal kull tghammira ta' daww li jgħorru t-traslokazzjoni F_1 huma rappurtati.

Għall-analiżi ċitogenetika tal-metafażi-dijakinezi I, in-numri tat-tipi tal-konfigurazzjonijiet multivalenti u n-numru totali taċ-ċelloli huma mnizzla għal kull wieħed li jgħorr it-traslokazzjoni.

Għall-individwi F_1 sterili, in-numru totali tat-tghammiriet u t-tul tal-perjodu tat-tghammir huma rappurtati. Il-piż tat-testikoli u d-detallji ta' l-analiżi ċitogenetika huma mogħtija.

Għan-nisa XO, il-medja tad-daqs tal-boton, ir-rata tas-sess ta' l-ulied F_2 u r-riżultati ta' l-analiżi ċitogenetika huma rappurtati.

Fejn ikunu possibbli daww li jgħorru t-traslokazzjoni F_1 huma magħzula minn qabel bit-testijiet tal-fertilità, it-tabelli għandhom jinkludu l-informazzjoni fuq kemm minn dawn kienu konfermati eterozigoti tat-traslokazzjoni.

Id-data mill-kontrolli negattivi u l-esperimenti pożittivi tal-kontroll huma rappurtati.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1 **IR-RAPPORT TAT-TEST**

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

- ir-razza tal-ġrieden, iż-żmien ta' l-animali, il-piż ta' l-animali trattati;
- in-numri ta' l-animali ġenituri ta' kull sess fil-gruppi esperimentali jew kontrollati;
- il-kundizzjonijiet ta' l-ittestjar, id-deskrizzjoni dettaljata tat-trattament, il-livelli tad-doża, is-solventi, iċ-ċedola tat-tghammir;
- in-numru u s-sess ta' l-ulied għal kull mara, in-numru u s-sess ta' l-ulied miżjud għall-analiżi tat-traslokazzjoni;
- il-hin u l-kriterji għall-analiżi tat-traslokazzjoni;
- in-numru u d-deskrizzjoni dettaljata ta' daww li jgħorru t-traslokazzjoni, inkluża d-data tat-tghammir u d-data tal-kontenut ta' l-utru, jekk applikabbli;
- il-proċeduri ċitogenetiċi u d-detallji ta' l-analiżi mikroskopika, preferibbilment bl-istampi;
- il-valutazzjoni statistika;
- id-diskussjoni tar-riżultati;
- l-interpretazzjoni tar-riżultati.

▼B

- 3.2 IL-VALUTAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI
Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.
- 4. **IR-REFERENZI**
Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

▼B

B.26. EŻAMI TA' TOSSIČITA ORALI SUB-KRONIKU
ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI
RIPETUTA TA' DOŻA GHAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA'
SPEČJI TA' ANIMALI GERRIEMA

1. METODU

Il-metodu għat-test tat-tossiċità orali sub-kronika huwa replika ta' l- OECD TG 408 (1998)

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kemikali, id-determinazzjoni tat-tossiċità orali sub-kronika bl-użu ta' dożi repetuti tista' ssir wara li l-informazzjoni tal-bidu fuq it-tossiċità tinkiseb mit-testijiet għat-tossiċità b'doża akuta jew repetuta għal 28 jum. L-istudju ta' 90 jum jipprovdi informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibbli li faċilment jista' jkun hemm minhabba espożizzjoni repetuta fuq perjodu imtawwal ta' żmien li jkopri l-maturazzjoni u t-tkabbir minn wara l-ftim sal-fażi adulta. L-istudju se jipprovdi informazzjoni fuq l-effetti tossiċi prinċipali, jindika l-organi bħala mira u l-possibiltà ta' akkumulazzjoni, u jista' jipprovdi kalkolu ta' livell ta' espożizzjoni bl-ebda effett avvers osservat li jista' jintuża fl-għażla tal-livelli ta' doża għal studji kroniċi u biex jiġu stabbiliti kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni umana.

Il-metodu jkompli jenfasizza l-*endpoints* newroloġiċi u jagħti indikazzjoni ta' effetti immunoloġiċi u riproduttivi. Tingħata importanza wkoll għall-htieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi bil-galbu ta' l-annimali, sabiex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni. Dan l-istudju għandu jippermetti l-identifikazzjoni tal-kemikali bil-potenzjal li jikkawżaw effetti newrotossici, immunoloġiċi jew organi riproduttivi, li jistgħu jwasslu għal iktar investigazzjoni bir-reqqa.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-doża: huwa l-ammont tas-sustanza tat-test somministrat. Id-doża tissarraf f'piż (g, mg) jew f'piż tas-sustanza tat-test per unit tal-piż ta' l-annimal għat-test (eż. Mg/kg), jew f'konċentrazzjonijiet dietetiċi kostanti (ppm).

Id-dożaġġ: huwa terminu ġenerali li jikkompreni d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

NOAEL: hija l-abbrevjazzjoni għal *no-observed-adverse-effect level* (livell bl-ebda effett avvers osservat) u huwa l-ogħla livel ta' doża fejn l-ebda sejbiet relatati ma' trattament avers ma ġew osservati.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza sperimentali għanda tkun somministrata kuljum, b'mod orali, f'dożi gradwali lil diversi gruppi ta' annimali sperimentali, doża wahda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 jum. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-annimali huma osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. Annimali li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju huma sottoposti għall-nekroskopija, u fi tmiem it-test dawk l-annimali li jsalvaw jiġu maqtula wkoll u sottoposti għan-nekroskopija.

▼B**1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST****1.4.1. It-thejjija ta' l-annimali**

Għandhom jiġu użati annimali b'saħħithom li jkunu adattaw ruħhom għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 ijiem u li ma kienux sugġetti għal preoċeduri sperimentali qabel. L-annimali għat-test għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċje, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u/jew l-età. L-annimali għandhom jiġu assenjati għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Il-gaġeġ għandhom jitqieghdu b'tali mod li l-effetti possibbli minhabba t-tqeghid tal-gaġġa jiġu minimizzati. Kull animal għandu jkollu numru ta' identifikazzjoni.

1.4.2. It-thejjija tad-dożi

Is-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors jew fid-dieta jew fl-ilma għax-xorb. Il-metodu tas-somministrazzjoni orali jiddependi mill-għan ta' l-istudju, u mill-proprietajiet fiżiko/kimiċi tal-materjal għat-test.

Fejn hu meħtieġ, is-sustanza għat-test tinhall jew tiġi sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkomandabbli li, kull fejn hu possibbli, jiġi kkunsidrat l-ewwel l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni akwea, u wara tiġi kkunsidrata soluzzjoni/emulsjoni fiż-żejt (eż. Iz-żejt tal-qamh) imbagħad bis-soluzzjoni possibbli f'mezzi oħra. Għall-mezzi li mhumiex ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa. L-istabilità tas-sustanza għat-test taht il-kundizzjonijiet ta' somministrazzjoni għandha tiġi determinata.

1.4.3. Il-Kundizzjonijiet tat-test**1.4.3.1. L-annimali sperimentali**

L-ispeċi l-aktar preferit huwa l-far għalkemm jisgħu jintużaw speċi gerriema oħra, eż. Il-ġurdien. Għandhom jintużaw razzi li huma komunement utilizzati fil-laboratorju ta' annimali żgħar u b'saħħithom. In-nisa qatt ma jkunu welldu u mhumiex tqal. Id-dożaġġ għandu jibda kemm jista' jkun malajr wara l-ftim u qabel ma l-annimali jkollhom disa' ġimghat. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati m'għandux jaqbeż + 20 % tal-valur medju ta' kull sess. Fejn isir studju preliminari għal studju fit-tul fuq it-tossiċità kronika, annimali mill-istess razza u speċi għandhom jintużaw fiż-żewġ studji.

1.4.3.2. In-numru u s-sess

Mill-inqas 20 animal (10 nisa u 10 rġiel) għandhom jintużaw f'kull livell tad-doża. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jidded bin-numru ta' annimali ppjanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Skond l-għarfien ta' qabel dwar l-analogu kimiċi jew magħluq, għandu jiġi kkunsidrat li jidded grupp satellita ta' għaxar annimali (hamsa għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u ta' l-oġġla doża għall-osservazzjoni tar-riversibbiltà jew tal-persistenza ta' kwalunkwe effetti tossiċi, wara l-perjodu ta' trattament. It-tul ta' żmien ta' dan il-perjodu post-trattament għandu jiġi determinat b'mod xieraq skond l-effetti li gew osservati.

▼B

1.4.3.3. *Il-livelli tad-doża*

Għandhom jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wiehed, hlief fejn hemm test ta' limitu (ara 1.4.3.4.). Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq ir-riżultati tad-doża repetuta jew ta' l-istudju tas-sejbiet tal-medda u għandhom jikkunsidraw kwalunkwe data tossikoloġika u tossikokinetika disponibbli li teżisti għas-sustanza tat-test jew l-annimali relatati. Sakemm ma tkunx limitata min-natura fiżiko-kemikali jew l-effetti bijoloġiċi tas-sustanza għat-test, l-ogħla livell ta' doża għandu jiġi magħżul bl-għan li jġib it-tossiċità iżda mhux il-mewt jew it-tbatija qawwiya. Sekwenza niezla tal-livell ta' doża għandha tingħazzel bl-għan li turi kwalunkwe rispons relata mad-dożaġġ u l-livell b'ebda effett avvers osservat (NOAEL) fl-iktar livell baxx tad-doża. Intervalli *two to four fold* huma ta' spiss ottimali biex jiġu ssettjati il-livelli neżlin tad-doża u ż-żieda tar-raba' grupp għat-test huwa ppreferut ta' spiss iktar mill-intervalli kbar (eż. iktar minn fattur ta' bejn wiehed u ieħor 6-10) bejn id-dożaġġi.

Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux trattat jew grupp ta' kontroll b'mezz jekk il-mezz jintuża fis-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test. Hlief għat-trattament bis-sustanza għat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod ta' dawk fil-gruppi għat-test. Jekk jintuża l-mezz, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-mezz fl-ogħla volum użat. Jekk sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta u tikkawża dhul dietetiku mnaqqas, imbagħad grupp ta' kontroll li jkun ġie magħluf jista' jghin jiddistingwu bejn tnaqqis minhabba l-palatabilità jew minhabba l-alterazzjonijiet tossikoloġiċi fil-mudell għat-test.

Il-karatteristiċi tal-mezz u additivi oħra li ġejjin għandhom jiġu kkunsidrati kif xieraq: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, jew ir-retenzjoni tas-sustanza għat-test; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u x-xorb jew fuq l-istatus nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.4.3.4. *It-test tal-limitu*

Jekk test f'livell wiehed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/gurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi *in-no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti b'avvers mhux osservat) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi relatati strutturalment, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika hlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-htieġa li jiġi użat livell oghla ta' doża.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Is-somministrazzjoni tad-doži**

L-annimali jingħataw id-dożaġġ bis-sustanza għat-test sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 jum. Kwalunkwe *regime* ta' dożaġġ ieħor, eż. Hamest ijiem fil-ġimgħa, irid ikun ġustifikat. Meta s-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors, dan għandu jsir f'doża waħda bl-użu ta' tubu għall-istonku jew intubazzjoni *canula* xierqa. Il-volum massimu tal-likwidu li jista' jiġi somministrat f'darba jiddependi mid-daqs ta' l-annimal. Il-volum m'għandux ikun iktar minn 1 ml/100g tal-piż tal-ġisem, hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet akwei fejn 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem jista' jintuża. Hlief għal sustanzi korrużivi jew ta' irritazzjoni, li normalment jizvelaw effetti aghar b'koncentrazzjonijiet oghla, il-varjabilità fil-volum tat-test għandha tipi minimizzata billi tiġi aġġustata l-koncentrazzjoni sabiex tihgura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

▼B

Għal dawk is-sustanzi somministrati permezz tad-dieta jew l-ilma għax-xorb huwa importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza għat-test involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza għat-test hija somministrata fid-dieta jew konċentrazzjoni dietetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal jistgħu jintużaw. L-użu alternattiv irid jiġi speċifikat. Għas-sustanza li tiġi somministrata bil-fors, id-doża għandha tingħata f'hinijiet simili kuljum, u aġġustata kif ikun mehtieg sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Fejn qed jintuża studju ta' 90 jum bħala studju preliminarju għal dak li jgħid dwar it-tossicità kronika, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

1.5.2. L-osservazzjonijiet

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun mill-inqas ta' 90 jum. L-annimali fi grupp satellita li huma skedati għal *follow-up* ta' l-osservazzjonijiet għandhom jinżammu għal perjodu xieraq mingħajr trattament sabiex tidher il-persistenza ta', jew l-irkupru mill-effetti tossiċi.

L-osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-inqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess hin (hinijiet) kuljum, waqt illi jiġi meqjus il-perjodu *peak* ta' l-effetti anticipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni klinika ta' l-annimali għandha tiġi rrekordjata. Mill-inqas darbtejn kuljum, normalment fil-bidu u fi tmiem il-jum, l-annimali kollha jiġu spezzjonati għal sinjali ta' morbidità jew ta' mortalità.

Ta' l-inqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex ikun hemm lok għall-paraguni fi hda is-sugġett), u darba fil-ġimgħa wara dan, l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru għall-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa fejn jitpoġġew, preferibbilment f'arena standard u f'hinijiet simili kull darba. Għandhom jiġu rrekordjati tajjeb, preferibbilment bl-użu ta' sistemi ta' mmarrar, definiti b'mod ċar mil-laboratorju għall-ittestjar. Għandu jsir sforz sabiex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' l-osservazzjoni huma minimali. Is-sinjali nnutati għandhom jinkludu, iżda mhux ikunu limitati għalihom, it-tibdil fil-ġilda, fil-pil, fl-għajnejn, fil-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxija u ta' l-eskrementi u ta' l-attività awtonomika (eż. il-lakrimazzjoni, il- *pilo-erection*, id-daqs tal-pupill, is-sistema respiratorja mhux normali). It-tibdil fil-mixja, fil-pożizzjoni u r-rispons għall-imaniġġjar kif ukoll il-preżenza ta' ċaqliq kloniku jew toniku, l-isterjotipi (eż. *grooming* eċċessiv, tidwir tond repetittiv) jew imġiba stramba (eż. Awto-mutilazzjoni, il-mixi b'lura) għandhom jiġu rrekordjati wkoll (1).

Lejn tmiem il-perjodu ta' l-espożizzjoni u mhux qabel il-11-il ġimgħa, għandha ssir reattività sensorjali għal stimuli ta' tipi differenti (1) (eż. awditorjali, stimuli viżwali u *proprioceptive*) (2), (3), (4), il-valutazzjoni tas-saħħa tal-qabda (5) u l-valutazzjoni *motor activity* (6). Detallji oħra fuq il-proċeduri li jistgħu jsegwu qegħdin fir-referenzi rispettivi. Madankollu, il-proċeduri alternattivi apparti dawk referenzjati jistgħu jintużaw ukoll.

L-osservazzjonijiet funzjonali magħmula lejn tmiem l-istudju jistgħu jithallaw barra meta d-data fuq l-osservazzjonijiet funzjonali tista' tittiehed minn studji oħra u l-osservazzjonijiet kliniċi ta' kuljum ma wrew l-ebda deficits funzjonali.

▼B

Hliet f'eccezzjoni, l-osservazzjonijiet funzjonali jistgħu jithallew barra wkoll għal gruppi li juru sinjali ta' tossiċità b'tali mod li jfikklu b'mod sinifikanti l-prestazzjoni funzjonali tat-test.

1.5.2.1. *Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/xorb*

L-annimali kollha għandhom jintiżnu mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ikel u tax-xorb għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza għat-test hija somministrata permezz ta' l-ilma għax-xorb, il-konsum ta' l-ilma għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa wkoll. Il-konsum ta' l-ilma jista' jitqies ukoll għal studji dietetiċi jew ta' ikel mogħti bil-fors li matulu l-attività tax-xorb tista' tiġi tinbidel.

1.5.2.2. *Il-hematoloġija u l-Bijokemistrija Klinika*

Il-kampjuni tad-demem għandhom jittiehdu minn site imsemmija u mahżuna, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Fi tmiem il-perjodu għat-test, il-kampjuni jingabru eżatti qabel jew bhala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali, u mahżuna f'kundizzjonijiet xierqa

L-eżaminazzjonijiet hematoloġiċi li ġejjin għandhom isiru fi tmiem il-perjodu għat-test u meta kwalunkwe kampjuni tad-demem interim ikunu ngabru: *Haematocrit*, konċentrazzjoni ta' *haemoglobin*, l-għadd ta' *erythrocyte*, l-għadd totali u differenzjali tal-*leucocyte*, l-għadd tal-*platelet* u l-kejl tal-hin/potenzjal tal-boċċi fid-demem.

Id-determinazzjonijiet tal-bijokemistrija klinika biex jinvestigaw effetti prinċipali tossiċi fit-tessuti u, speċifikament, l-effetti fuq il-kliwi u fuq il-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demem miksuba mill-annimali kollha eżatti qabel jew bhala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali (apparti ta' daww li jinstabu qed imutu u/jew jinqatlu). B'mod simili għall-investigazzjonijiet hematoloġiċi, jista' jsir it-tehid tal-kampjuni interim għat-testijiet bijokemikali kliniċi. Huwa rakkomandat is-sawm mal-lejl ta' l-annimali qabel it-tehid tal-kampjuni tad-demem⁽¹⁾. Id-determinazzjonijiet tal-plasma jew serum għandhom jinkludu is-sodju, il-putassa, il-glukożju, il-kolestorol totali, l-urea, in-nitroġenu fid-demem mill-urea, il-*creatinine*, il-proteini u l-albumin totali, u iktar minn żewġ enzimi li juru l-effetti hepatoċellulari (bħalma huma l-*alanine aminotransferase*, *aspartate aminotransferase*, *alkaline phosphatase*, *gamma glutamyl transpeptidase*, u *sorbitol dehydrogenase*). Il-kejl ta' enzimi addizzjonali (ta' oriġini epatika jew ohra) u aċidi tal-*bile* li jistgħu jipprovdu informazzjoni utli taħt ċerti ċirkostanzi, jista' jiġi nkluz ukoll.

B'għażla, id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina li ġejjin jistgħu jsiru waqt l-aħħar ġimgħa ta' l-istudju bl-użu tal-ġbir bil-hin tal-volum ta' l-urina; l-apparenza, il-volum, l-*osmolality* jew gravità speċifika, pH, il-proteini, il-glukożju u d-demem/iċ-celloli tad-demem.

Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar tas-serum ta' hsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet ohra li għandhom jitwettqu jekk il-proprietajiet magħrufa tas-sustanza għat-test jistgħu, jew huma suspettati li jaffettwaw il-profilu metaboliċi relatati jinkludu il-kalċju, il-fosforu, il-fasting triglycerides, l-ormoni speċifiċi, il-*methaemoglobin* u l-*cholinesterase*. Dawn iridu jiġu identifikati għall-kimiċi f'ċerti klassijiet jew fuq bażi ta' kull każ.

⁽¹⁾ Għal numru ta' kejl fis-serum u fil-plasma, l-iktar għall-glukożju, is-sawm mal-lejl ikun iktar preferut. Ir-raġuni prinċipali għal din il-preferenza hi li l-varjabbiltà li qed tiżdied u li bla dubju se tirriżulta min-nuqqas ta' sawm, tghatti l-effetti l-iktar moħbija u l-interpretazzjoni tkun iktar diffiċli. Min-naha l-oħra, madankollu, is-sawm mal-lejl jista' jfikkil il-metaboliżmu ġenerali ta' l-annimali u, b'mod partikulari fl-istudji ta' l-għalf. Jista' jfikkil ukoll l-espożizzjoni ta' kuljum għas-sustanza tat-test. Jekk jiġi adottat is-sawm mal-lejl, id-determinazzjonijiet bijokemikali u kliniċi għandhom jitwettqu wara t-tweqqieg ta' l-osservazzjonijiet funzjonali ta' l-istudju.

▼B

Fuq kollox, hemm il-bżonn ta' attitudni flessibbli skond l-ispeċi u l-effett osservat u/jew mistenni mis-sustanza mogħtija.

Jekk id-data storika mhix adegwata, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-varjabbli ematoloġiċi u tal-bijokemistrija kliniċi għandhomx bżonn jiġu determinati qabel ma jibda d-dożaġġ u ġeneralment mhuwiex rakkomandabbli li din id-data tiġi ġġenerata qabel it-trattament (7).

1.5.2.3 *Nekropsija Grossa*

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu suġġetti għall-awtopsja shiħa grossa ta' wara l-mewt li tinkludi eżaminazzjoni bir-reqqa tal-wieċ tal-ġisem, l-orifiċi kollha, u l-kavitajiet tal-kranju, tat-toraċi u dawk addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied, il-kliewi, l-adrenali, it-testi, l-*epididymides*, it-*thymus*, il-milsa, il-moħħ u l-qalb ta' l-annimali kollha (ħlief ta' dawk li jkunu qed imutu u/jew jiġu maqtula) għandhom jiġu trimmjati minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u għandhom ikunu mwieżna niedja malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex ma jinxfux.

It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni hispatoloġika maħsuba sussegwenti: il-feriti kbar kollha, il-moħħ (partijiet rappreżentattivi inkluzi iċ-*cerebrum*, iċ-*cerebellum* u l-*medulla/pons*), il-korda spinali (fi tliet livelli: ċevikali, *mid-thoracic* u *lumbar*) il-glandoli *pituitary*, *thyroid*, *parathyroid*, *thymus*, *oesophagus*, *salivary*, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inkluzi l-*Peyer's patches*), il-fwied, il-frixa, kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-trakea u l-pulmuni (ippreservati bl-inflazzjoni bil-*fixative* imbagħad bl-immersjoni), l-aorta, il-*gonads*, l-utru, l-organi sesswali aċċessorili, il-glandola mammarja femminili, il-prostata, il-bużzieqa ta' l-urina, il-*gall bladder* (il-ġurdien), in-noduli limfatiċi (preferibbilment nodulu limfatiku wiehed li jkopri r-rotta ta' l-amministrazzjoni u oħra distanti mir-rotta ta' l-amministrazzjoni biex tkopri l-effetti sistematiċi), in-nerv periferali (*sciatic* jew *tibial*) preferibbilment viċin il-muskolu, u biċċa mill-mudullun (jew, *a fresh bone marrow aspirate*), il-ġilda u l-ghajnejn (jekk ġew osservati xi tibdiliet waqt l-eżaminazzjonijiet oftalmoloġiċi). Is-sejbiet klinika u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu li hemm bżonn jiġu eżaminati tessuti addizzjonali. Kwalunkwe organi li jistgħu jkunu organi-mira bbażati fuq il-proprietajiet magħrufa tas-sustanza tat-test għandhom jiġu ppreservati.

1.5.2.4 *Il-hispatoloġija*

Il-hispatoloġija kompluta għandha titwettagħ fuq l-organi u t-tessuti ppreservati ta' l-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doża għolja. Dawn l-eżaminazzjonijiet għandhom jiġu estiżi għall-annimali tal-gruppi ta' dożaġġ l-oħrajn ukoll, jekk it-tibdil relatat mat-trattament jiġi osservat fil-grupp ta' doża għolja.

1.5.2.5. Il-feriti grossi kollha għandhom jiġu eżaminati.

Meta jintuża grupp satellita il-histopatoloġija għandha ssir fuq it-tessuti u l-organi identifikati bħala li qed juru l-effetti fil-gruppi trattati.



DATA U RAPPORTAĠĠ

2.1. DATA

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali nstabu mejta waqt it-test jew li nqatlu għal raġunijiet umani u l-hin ta' kwalunkwe mewt jew qtil uman, in-numru li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-hin ta' l-onset, it-tul, il-qawwa ta' kwalunkwe effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, it-tip ta' feriti u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip ta' ferita.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

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

2.2.1. Is-sustanza għat-test:

- In-natura fiżika, il-purità u il-proprjetajiet fiżiko-kemikali;
- Id-data ta' identifikazzjoni;
- Il-mezz (jekk inhu xieraq): il-ġustifikazzjoni għall-ghażla tal-mezz, jekk mhuwiex l-ilma.

2.2.2. L-ispeċi għat-test:

- l-ispeċi/is-silta użati;
- In-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;
- Is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, id-dieta eċċ.;
- Il-pizijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test

2.2.3. Il-kundizzjonijiet għat-test:

- Ir-*rationale* għall-ghażla tal-livell tad-doża;
- Id-dettalji tat-thejġija tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza għat-test, il-konċentrazzjoni miksuba u l-omoġeneità tat-thejġija;
- id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;
- Id-dożi kif inhuma tabilhaqq (mg/kg piż tal-ġisem/jum), u l-fattur tal-konverżjoni mill-konċentrazzjoni tat-test għas-sustanza tad-dieta/l-ilma għax-xorb (ppm) għad-doża kif inhi tabilhaqq, jekk applikabbli;
- Id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma

2.2.4. Ir-riżultati:

- Il-piż tal-ġisem/it-tibdil fil-piż tal-ġisem;
- Il-konsum ta' l-ikel u ta' l-ilma jekk applikabbli;
- Id-data tar-rispons tossiku bis-sess u bil-livell tad-doża, inklużi s-sinjali tat-tossiċità;

▼B

- In-natura, il-qawwa u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex reversibbli jew le);
- Ir-rizultati ta' l-eżaminazzjoni oftalmoloġika;
- l-attività sensorjali, is-saħħa tal-qabda ta' l-id u l-valutazzjonijiet *motor activity*;
- it-testijiet ematoloġiċi bil-valuri *base-line* rilevanti;
- it-testijiet tal-bijokemistrija klinika bil-valuri *base-line* rilevanti;
- il-piż tal-ġisem terminali, il-piżijiet ta' l-organi u r-ratios tal-piż ta' l-organi u tal-ġisem;
- is-sejbiet tan-nekropsija;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet histopatoloġiċi kollha;
- Id-data ta' l-assorbiment jekk hi disponibbli;
- trattament statistiku tar-rizultati, fejn hu xieraq;

Id-diskussjoni tar-rizultati;

Konkluzjonijiet.

3.1.

REFERENZI

IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.

Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.

Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.

Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.

Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.

Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, 198-201.

▼B

**B.27. EŻAMI TA' TOSSIĊITÀ ORALI SUB-KRONIKU
ESPERIMENT BIS-SOMMINISTRAZZJONI ORALI
RIPETUTA TA' DOŻI GHAL 90 ĠURNATA BL-UŻU TA'
SPEĊI TA' ANIMALI MHUX GERRIEMA**

1. METODU

Il-metodu għat-test tat-tossiċità orali sub-kronika huwa replika ta' l-OECD TG 409 (1998)

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' kemikali, id-determinazzjoni tat-tossiċità orali sub-kronika bl-użu ta' dozi repetuti tista' ssir wara li l-informazzjoni tal-bidu fuq it-tossiċità tinkiseb mit-testijiet għat-tossiċità b'doża akuta jew repetuta għal 28 jum. L-istudju ta' 90 jum jipprovdi informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibbli li faċilment jista' jkun hemm minhabba espożizzjoni repetuta għal perjodu ta' tkabbir mghaġġel sal-fażi adulta. L-istudju se jipprovdi informazzjoni fuq l-effetti tossiċi prinċipali, jindika l-organi bħala mira u l-possibiltà ta' akkumulazzjoni, u jista' jipprovdi kalkolu ta' livell ta' espożizzjoni bl-ebda effett avvers osservat li jista' jintuża fl-għażla tal-livelli ta' doża għal studji kroniċi u biex jiġu stabbiliti kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni umana

Dan il-metodu għat-test għandu jippermetti l-identifikazzjoni ta' l-effetti avversi minhabba l-espożizzjoni kemikali fl-ispeċi li mhumiex gerriema u għandu jintuża biss:

- fejn l-effetti osservati fi studji oħra jindikaw il-htieġa għal klarifikazzjoni/karatterizzazzjoni fit-tieni speċi, li mhix gerriema, jew
- fejn l-istudji tossikokinetiċi jindikaw li l-użu ta' speċi mhux gerriema speċifika hija l-iktar għażla rilevanti għall-animall tal-laboratorju, jew
- fejn raġunijiet speċifiċi oħra jiġġustifikaw l-użu ta' speċi li mhix gerriema.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Id-doża: huwa l-ammont tas-sustanza tat-test somministrat. Id-doża tissarraf f'piż (g, mg) jew f'piż tas-sustanza tat-test per unit tal-piż ta' l-animall għat-test (eż. Mg/kg), jew f'koncentrazzjonijiet dietetiċi kostanti (ppm).

Id-dożaġġ: huwa terminu ġenerali li jikkompreni d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

NOAEL: hija l-abbrevjazzjoni għal *no-observed-adverse-effect level* (livell bl-ebda effett avvers osservat) u huwa l-ogħla livell ta' doża fejn l-ebda sejbiet relatati ma' trattament avvers ma ġew osservati.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza għat-test għandha tigi somministrata kuljum, b'mod orali, f'dozi gradwali lil diversi gruppi ta' animali sperimentali, doża wahda għal kull grupp għall-perjodu ta' 90 jum. Matul il-perjodu ta' somministrazzjoni, l-animalli huma osservati mill-qrib għal sinjali ta' tossiċità. Animalli li jmutu jew jinqatlu matul l-istudju huma sottoposti għall-nekroskopija, u fi tmiem it-test daww l-animalli li jsalvaw jiġu maqtula wkoll u sottoposti għan-nekroskopija.

▼B**1.4. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST****1.4.1. L-ghażla ta' l-ispeċi ta' l-annimali**

L-ispeċi li mhumie x gerriema l-aktar użat huwa l-kelb, li għandu jkun ta' razza definita. Il-*beagle* (kelb żgħir tal-kaċċa) jintuża ta' spiss. Jistgħu jintużaw ukoll speċi oħra, eż. hanżir, u ħnieżer żgħar. Il-primati mhumie x rakkomandabbli u l-użu tagħhom għandu jkun ġustifikat. Għandhom jintużaw annimali żgħażaġh u b'saħħithom, u fil-każ tal-kelb, id-dożaġġ għandu jibda idealment mill-età ta' erba' sa sitt xhur u mhux aktar tard minn disa' xhur. Meta jsir studju preliminari għal dak iktar fit-tul dwar it-tossicità kronika, l-istess speċi/razza għandha tintuża fiz-żewġ studji.

1.4.2. It-thejija ta' l-annimali

Għandhom jiġu użati annimali b'saħħithom li jkunu adattaw ruħhom għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju u li ma kinux suġġetti għal proċeduri sperimentali qabel. It-tul ta' żmien ta' l-adattament jiddependi fuq l-ispeċi magħżula u s-sors tagħhom. Huma rakkomandati mill-inqas 5 ijiem għall-klieb jew hanżir tar-razza li ġejjin minn kolonja residenti u mill-inqas ħmistax għal daww l-annimali li ġejjin minn sorsi esterni. L-annimali għat-test għandhom ikunu karatterizzati skond l-ispeċje, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u/jew l-età. L-annimali għandhom jiġu assenjati bl-addoċċ għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Il-gaġeġ għandhom jitqiegħdu b'tali mod li l-effetti possibbli minhabba t-tqegħid tal-gaġġa jiġu minimizzati. Kull annimal għandu jkollu numru ta' identifikazzjoni

1.4.3. It-thejija tad-dożi

Is-sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta jew fl-ilma għax-xorb, permezz ta' l-ghalf mogħti bil-fors jew fil-kapsuli. Il-metodu tas-somministrazzjoni orali jiddependi mill-ghan ta' l-istudju, u mill-proprietajiet fiziko/kimiċi tal-materjal għat-test.

Fejn hu meħtieġ, is-sustanza għat-test tinhall jew tiġi sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkomandabbli li, kull fejn hu possibbli, jiġi kkunsidrat l-ewwel l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni akwea, u wara tiġi kkunsidrata soluzzjoni/emulsjoni fiz-żejt (eż. Iz-żejt tal-qamħ) imbagħad bis-soluzzjoni possibbli f'mezzi oħra. Għall-mezzi li mhumie x ilma l-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa. L-istabilità tas-sustanza għat-test taht il-kundizzjonijiet ta' somministrazzjoni għandha tiġi determinata

1.5. IL-PROCEDURA**1.5.1. In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Mill-inqas 8 annimali (erba' nisa u erba' rgħiel) għandhom jintużaw f'kull livell tad-doża. Jekk il-qtil interim ikun pjanat, in-numru għandu jiddependi bin-numru ta' annimali pplanati li jinqatlu qabel tmiem l-istudju. Skond l-gharfien ta' qabel dwar is-sustanza jew l-analogu magħluq, għandu jiġi kkunsidrat li jiddependi grupp satellita ta' 8 annimali (erbgha għal kull sess) fil-grupp ta' kontroll u ta' l-oghla doża għall-osservazzjoni tar-riversibbiltà jew tal-persistenza ta' kwalunkwe effetti tossiċi, wara l-perjodu ta' trattament. It-tul ta' żmien ta' dan il-perjodu post-trattament għandu jiġi determinat b'mod xieraq skond l-effetti li ġew osservati.

▼B

1.5.2. **Id-dożaġġ**

Għandhom jintużaw mill-inqas tlett livelli ta' doża u kontroll wiehed, hliet fejn hemm test ta' limitu (ara 1.5.3.). Il-livelli tad-doża jistgħu jkunu bbażati fuq ir-riżultati tad-doża repetuta jew ta' l-istudju tas-sejbiet tal-medda u għandhom jikkunsidraw kwalunkwe data tossikoloġika u tossikokinetika disponibbli li teżisti għall-compound tat-test jew il-materjali relatati. Sakemm ma tkunx limitata min-natura fiżiko-kemikali jew l-effetti bijoloġiċi tas-sustanza għat-test, l-ogħla livell ta' doża għandu jiġi magħżul bl-għan li jiġi it-tossiċità iżda mhux il-mewt jew it-tbatija qawwija. Sekwenza niezla tal-livell ta' doża għandha tingħazel bl-għan li turi kwalunkwe rispons relata mad-dożaġġ u l-livell b'ebda effett avvers osservat (NOAEL) fl-iktar livell baxx tad-doża. Intervalli two to four fold huma ta' spiss ottimali biex jiġu ssettjati il-livelli neżlin tad-doża u ż-żieda tar-raba' grupp għat-test huwa ppreferut ta' spiss iktar mill-intervalli kbar (eż. iktar minn fattur ta' bejn wiehed u iehor 6-10) bejn id-dożaġġi.

Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux trattat jew grupp ta' kontroll b'mezz jekk il-mezz jintuża fis-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test. Hliet għat-trattament bis-sustanza għat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jiġu trattati bl-istess mod ta' dawk fil-gruppi għat-test. Jekk jintuża l-mezz, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-mezz fl-ogħla volum użat. Jekk sustanza għat-test tiġi somministrata fid-dieta u tikkawża dħul dietetiku mnaqqas, imbagħad grupp ta' kontroll li jkun ġie magħluf jista' jgħin biex jiddistingwu bejn tnaqqis minhabba l-palatabilità jew minhabba l-alterazzjonijiet tossikoloġiċi fil-mudell għat-test.

Il-karatteristiċi tal-mezz u additivi oħra li ġejjin għandhom jiġu kkunsidrati kif xieraq: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, jew ir-retenzjoni tas-sustanza għat-test; l-effetti fuq il-proprietajiet kemikali tas-sustanza għat-test u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u x-xorb jew fuq l-istatus nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.5.3. **It-test tal-limitu**

Jekk test f'livell wiehed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/gurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi mhux osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx meħtieġ. It-test tal-limitu japplika hliet meta l-espożizzjoni umana tindika il-htiega li jiġi użat livell oghla ta' doża.

1.5.4. **Is-somministrazzjoni tad-doži**

L-annimali jingħataw id-dożaġġ bis-sustanza għat-test sebat ijiem kull ġimgħa għal perjodu ta' 90 jum. Kwalunkwe *regime* ta' dożaġġ iehor, eż. Hamest ijiem fil-ġimgħa, irid ikun ġustifikat. Meta s-sustanza għat-test tiġi somministrata bil-fors, dan għandu jsir f'doża waħda bl-użu ta' tubu għall-istonku jew intubazzjoni *cannula* xierqa. Il-volum massimu tal-likwidu li jista' jiġi somministrat f'darba jiddependi mid-daqs ta' l-annimal. Normalment il-volum għandu jinżamm baxx kemm jista' jkun. Hliet għal sustanzi korrużivi jew ta' irritazzjoni, li normalment jiżvelaw effetti aghar b'konċentrazzjonijiet oghla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-konċentrazzjoni sabiex tiżgura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

▼B

Għal dawk is-sustanzi somministrati permezz tad-dieta jew l-ilma għax-xorb huwa importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza għat-test involuta ma jfixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza għat-test hija somministrata fid-dieta jew konċentrazzjoni dietetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal jistgħu jintużaw. L-użu alternattiv irid jiġi speċifikat. Għas-sustanza li tiġi somministrata bil-fors, id-doża għandha tingħata f'hinijiet simili kuljum, u aġġustata kif ikun mehtieg sabiex jinżamm livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal. Fejn qed jintuża studju ta' 90 jum bħala studju preliminarju għal dak li jidher dwar it-tossiċità kronika, għandha tintuża dieta simili fiż-żewġ studji.

1.5.5. L-osservazzjonijiet

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun mill-inqas ta' 90 jum. L-annimali fi grupp satellita li huma skedati għal *follow-up* ta' l-osservazzjonijiet għandhom jinżammu għal perjodu xieraq mingħajr trattament sabiex tidher il-persistenza ta', jew l-irkupru mill-effetti tossiċi.

L-osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-inqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess hin (hinijiet) kuljum, waqt illi jiġi meqjus il-perjodu *peak* ta' l-effetti anticipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni klinika ta' l-annimali għandha tiġi rrekordjata. Mill-inqas darbtejn kuljum, normalment fil-bidu u fi tmiem il-jum, l-annimali kollha għandhom jiġu spezzjonati għal sinjali ta' morbidità jew ta' mortalità.

Ta' l-inqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex ikun hemm lok għall-paraguni fi hdan is-suġġett), u darba fil-ġimgħa wara dan, l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru għall-annimali kollha. Dawn l-osservazzjonijiet għandhom isiru barra l-gaġġa fejn jitpoġġew, preferibbilment f'arena standard u f'hinijiet simili kull darba. Għandu jsir sforz sabiex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet ta' l-osservazzjoni huma minimali. Is-sinjali tat-tossiċità għandhom jiġu rrekordjati tajjeb, inkluzi l-hin ta' l-onset, il-grad u t-tul ta' żmien. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu, iżda mhux ikunu limitati għalihom, it-tibdil fil-ġilda, fil-pil, fl-għajnejn, fil-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxija u ta' l-eskrementi u ta' l-attività awtonomika (eż. il-lakrimazzjoni, il-*pilo-erection*, id-daqs tal-pupill, attività respiratorja mhux normali). Bidliet fil-mixja, fil-pożizzjoni u r-rispons għall-imanigġjar kif ukoll il-preżenza ta' ċaqliq kloniku jew toniku, l-isterjotipi (eż. *grooming* eċċessiv, tidwir tond repetittiv) jew imġiba stramba għandhom jiġu rrekordjati.

L-eżaminazzjoni oftalmoloġika, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir xieraq ekwivalenti, għandha ssir qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u fi tmiem l-istudju, preferibbilment fl-annimali kollha iżda għallinqas fil-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll. Jekk ikun hemm tibdil fil-għajnejn relatat mat-trattament l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati.

1.5.5.1. Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/xorb

L-annimali kollha għandhom jintiznu mill-inqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ikel u tax-xorb għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa. Jekk is-sustanza għat-test hija somministrata permezz ta' l-ilma għax-xorb, il-konsum ta' l-ilma għandu jitkejjel għallinqas kull ġimgħa wkoll. Il-konsum ta' l-ilma jista' jitqies ukoll għal studji dietetiċi jew ta' ikel mogħti bil-fors li matulu l-attività tax-xorb tista' tinbidel.

▼B

1.5.5.2. *Il-hematologija u l-Bijokemistrija Klinika*

Il-kampjuni tad-demem għandhom jittiehdu minn site imsemmija u mahżuna, jekk applikabbli, f'kundizzjonijiet xierqa. Fi tmiem il-perjodu għat-test, il-kampjuni jingabru eżatti qabel jew bhala parti mill-proċedura tal-qtil ta' l-annimali.

Il-hematologija, inklużi l-*haematocrit*, il-konċentrazzjoni ta' *haemoglobin*, l-għadd ta' l-*erythrocyte*, l-għadd totali u differenzjali tal-*leukocyte*, l-għadd tal-*platelet* u l-kejl ta' potenzjal għall-boċċi (*clotting*) bħalma hu l-hin ta' l-iffurmar tal-boċċi, il-hin tal-*prothrombin*, jew il-hin tat-*thromboplastin* għandhom jiġu investigati fil-bidu ta' l-istudju, imbagħad jew f'intervalli ta' xhur jew f'nofs triq tal-perjodu tat-test u fl-aħħarnett fi tmiemu.

Id-determinazzjonijiet tal-bijokemistrija klinika biex jinvestigaw effetti principali tossiċi fit-tessuti u, speċifikament, l-effetti fuq il-kliwi u fuq il-fwied, għandhom isiru fuq il-kampjuni tad-demem miksuba mill-annimali fil-bidu, imbagħad f'intervalli ta' xhur jew f'nofs it-test u fl-aħħarnett fi tmiem il-perjodu tat-test. Iz-zoni tat-test li għandhom jiġu kkunsidrati huma l-bilanċ electrolyte, il-metabolizmu tal-carbohydrate, u l-funzjoni tal-fwied u l-kliwi. L-għażla tat-testijiet speċifiċi tkun influwenzata mill-osservazzjonijiet ta' l-azzjoni tas-sustanza għat-test. L-annimali għandhom ikunu sajmin għal perjodu xieraq għall-ispeċi u qabel it-tehid tal-kampjuni tad-demem. Id-determinazzjonijiet sugġeriti jinkludu l-kalċju, il-fosfru, il-klorur, is-sodju, il-potassju, il-glukożju swami, l-*alanine*, l-*aminotransferase*, l-*aspartate aminotransferase*, l-*ornithine decarboxylase*, il-*gamma glutamyl transpeptidase*, l-*urea nitrogen*, l-*albumin*, il-*blood creatinine*, it-total tal-*bilirubin* u t-total tal-kejl tas-*serum protein*.

Id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina għandhom isiru għal-linġas fil-bidu, imbagħad fin-nofs u fl-aħħarnett fi tmiem l-istudju bil-urina. Id-determinazzjonijiet ta' l-analiżi ta' l-urina jinkludu l-apparenza, il-volum, l-*osmolality* jew il-gravità speċifika, il-pH, il-proteini, il-glukożju u d-demem/iċ-ċelloli tad-demem. Parametri addizzjonali jistgħu jintużaw fejn hu mehtieg biex l-investigazzjoni ta' l-effetti(i) osservat(i) tiġi estiża.

Barra minn hekk, l-istudji biex jinvestigaw l-immarkar ta' hsara ġenerali għat-tessuti għandhom jiġu kkunsidrati. Determinazzjonijiet oħra li jistgħu jkunu mehtieġa għal evalwazzjoni tossikoloġika adegwata jinkludu l-analiżi tal-lipidi, ta' l-ormoni, tal-bilanċ aċdu/bażi, tal-methaemoglobin, u ta' l-inibizzjoni tal-*cholinesterase*. Il-bijokemistrija klinika addizzjonali tista' tintuża fejn hu mehtieg sabiex l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati tiġi estiża. Dawn iridu jiġu identifikati għall-kimiċi f'ċerti klassijiet jew fuq bażi ta' kull każ.

Fuq kollox, hemm il-bżonn ta' attitudni flessibbli skond l-ispeċi u l-effetti osservat u/jew mistenni mis-sustanza mogħtija.

1.5.5.3. *Nekropsija Grossa*

L-annimali kollha fl-istudju għandhom ikunu sugġetti għall-awtopsja shiha grossa ta' wara l-mewt li tinkludi eżaminazzjoni bir-reqqa tal-wiċċ tal-ġisem, l-orifiċi kollha, u l-kavitajiet tal-kranju, tat-toraċi u dawk addominali u l-kontenut tagħhom. Il-fwied bil-*gall bladder*, il-kliwi, l-adrenali, it-testi, l-*epididymides*, l-*ovaries*, l-utru, it-*thyroid* (bil-*parathyroids*) it-*thymus*, il-milsa, il-moħħ u l-qalb ta' l-annimali kollha (hlief ta' dawk li jkunu qed imutu u/jew jiġu maqtula) għandhom jiġu trimmjati minn kwalunkwe tessut aderenti, kif xieraq, u għandhom ikunu mwieżna niedja malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex ma jinxfix.

▼B

It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu preservati fl-iktar medium xieraq kemm għat-tip ta' tessut u kemm għall-eżaminazzjoni hispatoloġika maħsuba sussegwenti: il-feriti kbar kollha, il-mohħ (partijiet rappreżentattivi inklużi iċ-ċerebrum, iċ-ċerebellum u l-*medulla/pons*), il-korda spinali (fi tliet livelli: ċervikali, *mid-thoracic* u *lumbar*) il-glandoli tal-*pituitary*, l-għajnejn, il-glandoli tat-*thyroid*, tal-*parathyroid*, tat-*thymus*, ta l-*oesophagus*, u dawk *salivary*, l-istonku, l-intestini żgħar u kbar (inklużi l- *Peyer's patches*), il-fwied, il-*gall bladder*, il-frixa, kliewi, l-adrenali, il-milsa, il-qalb, it-trakea u l-pulmuni, l-aorta, il-*gonads*, l-utru, l-organi sesswali aċċessorili, il-glandola mammarja femminili, il-prostata, il-bużżieqa ta' l-urina, in-noduli limfatiċi (preferibbilment nodulu limfatiċu wiehed li jkopri r-rotta ta' l-amministrazzjoni u oħra distanti mir-rotta ta' l-amministrazzjoni biex tkopri l-effetti sistematiki), in-nerv periferali (*sciatic* jew *tibial*) preferibbilment viċin il-muskolu, u biċċa mill-mudullun (u/jew, *a fresh bone marrow aspirate*) u l-gilda. Is-sejbiet klinikali u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu li hemm bżonn jiġu eżaminati tessuti addizzjonali. Kwalunkwe organi li jistgħu jkunu organi-mira bbażati fuq il-proprietajiet magħrufa tas-sustanza tat-test għandhom jiġu ppreservati.

1.5.5.4. *Il-hispatoloġija*

Il-hispatoloġija kompluta għandha titwettaq fuq l-organi u t-tessuti ppreservati ta' għallinqas l-annimali kollha fil-gruppi ta' kontroll u ta' doza għolja. L-eżaminazzjoni għandha tiġi estiża għall-annimali tal-gruppi ta' doża ġgħ, jekk it-tibdil relatat mat-trattament jiġi osservat fil-grupp ta' doza għolja.

Il-feriti grossi kollha għandhom jiġu eżaminati

Meta jintuza grupp satellita il-hispatoloġija għandha ssir fuq it-tessuti u l-organi identifikati bħala li qed juru l-effetti fil-gruppi trattati.

2. DATA U RAPPORTAĠĠ

2.1. DATA

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun riassunta f'għamla tabulari, li turi għal kull grupp tat-test, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li nstabu mejta waqt it-test jew li nqatlu għal raġunijiet umani u l-hin ta' kwalunkwe mewt jew qtil uman, in-numru li juri sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluż il-hin ta' l-*onset*, it-tul, il-qawwa ta' kwalunkwe effetti tossiċi, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, it-tip ta' feriti u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip ta' ferita.

Meta huwa applikabbli, ir-riżultati numerici għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' statistika xieraq u ġeneralment aċċettat. Il-metodi statistiċi u d-data li trid tiġi analizzata għandha tingħazel waqt id-disinn ta' l-istudju.

2.2. IR-RAPPORT TAT-TEST

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

▼B

- 2.2.1. **Is-sustanza għat-test:**
- In-natura fizika, il-purità u il-proprietajiet fiziko-kemikali;
 - Id-data ta' identifikazzjoni;
 - Il-mezz (jekk inhu xieraq): il-ġustifikazzjoni għall-ghażla tal-mezz, jekk mhuwiex l-ilma.
- 2.2.2. **L-ispeċi għat-test:**
- L-ispeċi/is-silta użati;
 - In-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;
 - Is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, id-dieta eċċ.;
 - Il-pizijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.
- 2.2.3. **Il-kundizzjonijiet għat-test:**
- Ir-*rationale* għall-ghażla tal-livell tad-doża;
 - Id-dettalji tat-thejġja tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza għat-test, il-koncentrazzjoni; miksuba u l-omogeneità tat-thejġja;
 - Id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;
 - Id-dożi kif inhuma tabilhaqq (mg/kg piż tal-ġisem/jum), u l-fattur tal-konverżjoni mill-koncentrazzjoni tat-test għas-sustanza tad-dieta/l-ilma għax-xorb (ppm) għad-doża kif inhi tabilhaqq, jekk applikabbli;
 - Id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma.
- 2.2.4. **Ir-riżultati:**
- Il-piż tal-ġisem/it-tibdil fil-piż tal-ġisem;
 - Il-konsum ta' l-ikel u ta' l-ilma jekk applikabbli;
 - Id-data tar-rispons tossiku bis-sess u bil-livell tad-doża, inklużi s-sinjali tat-tossicità;
 - In-natura, il-qawwa u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex reversibbli jew le);
 - L-eżaminazzjoni oftalmoloġika;
 - It-testijiet ematoloġiċi bil-valuri *base-line* rilevanti;
 - It-testijiet tal-bijokemistrija klinika bil-valuri *base-line* rilevanti;
 - Il-piż tal-ġisem terminali, il-pizijiet ta' l-organi u r-*ratios* tal-piż ta' l-organi u tal-ġisem;
 - Is-sejbiet tan-nekropsija;
 - Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet histopatoloġiċi kollha;
 - Id-data ta' l-assorbiment jekk hi disponibbli;
 - Trattament statistiku tar-riżultati, fejn hu xieraq;
- Id-diskussjoni tar-riżultati
- Konklużjonijiet.

▼B**B.28. STUDJU TAT-TOSSICITÀ DERMALI SUB-KRONIKA STUDJU DERMALI TAD-DOŻA RIPETUT GHAL 90 ĠURNATA LI JUŻA SPEĊI TA' MAMMALI GERRIEMA****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

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

1.5. KRITERJI TAL-KWALITÀ

Xejn.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**Preparazzjonijiet**

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

*Kundizzjonijiet tat-test**Annimali esperimentali*

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

▼B

Numru u sess

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

Livelli tad-doża

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

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

Test ta' limitu

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

Perijodu t'osservazzjoni

L-annimali sperimentali ghandhom ikunu osservati ta' kuljum għal sinjali ta' tossiċità. Il-hin tal-mewt u l-hin li fih jidhru s-sinjali tat-tossiċità ghandhom ikunu miżmumin.

▼B

Proċedura

L-annimali għandhom jiġu magħluqin go gaggħa individwalment. L-annimali għandhom jiġu ttrattati bis-sustanza tat-test, idealment fuq bażi ta' sebat ijiem fil-ġimgha, għal perjodu ta' 90 ġurnata.

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

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

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

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

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

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

- (a) Eżami oftalmoloġiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir addattat ekwivalenti, għandu jiġi magħmul qabel l-espożizzjoni għas-sustanza tat-test u fit-terminu ta' l-istudju, preferibbilment fuq kull animal iżda mill-inqas fuq l-annimali tad-doża qawwija u fuq dawk tal-kontroll. Jekk tibdiliet fl-għajnejn huma skoperti l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati.
- (b) Ematoloġija, inklużi l-ematokrit, il-konċentrazzjoni ta' l-emoglobina, il-kwantità ta' l-eritroċit, it-total u d-differenzali tal-kwantità ta' l-eritroċit, u l-qjies tal-potenzal tat-tagħqid tad-dem, bħall-hin tat-tagħqid, il-hin tal-protrombin, il-hin tal-tromboplastin, jew il-kwantità tad-diski ż-żgħar fid-dem, għandhom ikunu nvestigati fit-terminu tal-perjodu tat-test.

▼B

(c) Determinazzjoni tal-bijokimika tal-klinika fuq id-demm għandha tkun magħmula fit-terminu tal-perjodu tat-test. Iż-żoni tat-test li huma konsiderati xierqa għall-istudji kollha huma l-bilanċ elettrolit, il-metabolizmu tal-karboidrati, il-funzjoni tal-fwied u tal-kliewi. Is-selezzjoni ta' testijiet speċifiċi jiġu nfluwenzati b'osservazzjonijiet fuq il-mod t'azzjoni tas-sustanza. Determinazzjonijiet sugġeriti huma l-kalċju, l-fosfru, l-kloru, s-sodju, l-potassju, il-glukożju tas-sawm (b'perjodu ta' sawm addattat għall-ispeċi), transaminat tas-serkum glutamiku pirviku [6], transaminat tas-serum glutamiku ozaloċetiku [7], dekarbonat ta' l-ornitin, transpeptidu tal-gamma glutamiku, nitroġenu ta' l-urea, albumina, kreatina tad-demm, u t-total tal-qjies tal-proteini tal-bilirubin u tas-serum. Determinazzjonijiet oħrajn li jistgħu jkunu neċessarji għal valutazzjoni xierqa tossikoloġika jinkludu analiżi tal-lipidi, ormoni, bilanċ ta' l-aċidu/alkali, attività metemoglobina u kolinestera. Bijokimika tal-klinika addizzjonali tista' tkun użata fejn ikun neċessarju sabiex tiġi estiża l-investigazzjoni ta' l-effetti osservati.

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

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

Nekroskopija totali

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

Eżami istopatoloġiku

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

(b) Kull hsara serja għandha tiġi eżaminata.

▼B

- (c) Organi tat-targit fi gruppi ta' doża oħrajn għandhom jiġu eżaminati.
- (d) Fejn il-firien huma użati, il-pulmuni ta' l-annimali fil-gruppi ta' doża baxxa u intermedja għandhom jiġu soġġetti għal eżami istopatoloġiku għal evidenza ta' infezzjoni, billi dan jipprovdli valutazzjoni konvenjenti ta' l-istat ta' saħħa ta' l-annimali. Eżami istopatoloġiku iktar fil-fond jista' ma jkunx meħtieġ bħala rutina fuq l-annimali f'dawn il-gruppi, iżda għandu dejjem isir fl-organi li juru evidenza ta' hsara fil-gruppi ta' doża qawwija.
- (e) Meta grupp subordinat huwa użat, l-istopatoloġija għandha tkun magħmula fuq it-tessuti u fuq l-organi identifikati bħala li juru effetti fil-gruppi l-oħrajn ittrattati.

2. DATA

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

3. RAPPORTAĠĠ

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

- in-nisel ta' l-ispeċi jew ir-razza, minn fejn ġejja l-ispeċi, il-kundizzjonijiet ta' l-ambjent, dieta;
- il-kundizzjonijiet tat-test;
- il-livelli tad-doża (inkluża xi sustanza, jekk użata) u konċentrazzjonijiet;
- data tar-rispons tossiku, bis-sess u d-doża;
- il-livell fejn m'hemmx effett, meta possibbli;
- il-hin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali ssopravvivew sat-tmiem;
- deskrizzjoni ta' effetti tossiċi jew effetti oħrajn (b'attenzjoni partikolari għal skoperti tal-klinika);
- il-hin ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal anormali u ż-żmien sussegwenti;
- data ta' l-għalf u tal-piż tal-ġisem;
- skoperti oftalmoloġiċi;
- testijiet ematoloġiċi użati u r-riżultati kollha;
- testijiet tal-bijokimika tal-klinika użati u r-riżultati kollha (inklużi r-riżultati ta' xi analiżi kimika ta' l-awrina);
- skoperti tan-nekroskopija;

▼B

- dekrizzjoni dettaljata ta' l-iskoperti istopatologiċi kollha;
- trattament ta' l-istatistika tar-riżultati fejn huwa xieraq;
- diskussjoni tar-riżultati;
- interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

4. REFERENZI

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

▼M4

B.29. TOSSIĊITÀ TA' INALAZZJONI SUBKRONIKA: STUDJU TA' 90 JUM**SOMMARJU**

Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.29 rivedut tfassal biex jikkaratterizza b'mod shiħ 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 ġimgha) għal a) il-kimika għall-ittestjar fi tliet livelli jew aktar ta' konċentrazzjoni, b) l-arja ffiltrata (kontroll negattiv), u/jew c) il-vejġikolu (kontroll ta' vejġikolu). L-annimali jkunu esposti ġeneralment għal 5 ijiem fil-ġimgha iżda l-espożizzjoni għal 7 ijiem fil-ġimgha hija wkoll permessa. L-iġiel u nisa jkunu dejjem ittestjati, iżda jkunu jistgħu jiġu esposti f'livelli differenti ta' konċentrazzjoni jekk ikun magħruf li sess wieħed ikun aktar suxxettibbli għal kimika partikolari għall-ittestjar. Dan il-metodu jippermetti lid-direttur tal-istudju jkun flessibbli biex jinkludi gruppi satellitarji (riversibbli), qatliet interim, hasil tal-bronkoalveolari (BAL), testijiet newroloġiċi u patoloġija klinika addizzjonali u evalwazzjonijiet istopatoloġiċi biex it-tossiċità ta' kimika għall-ittestjar tkun ikkaratterizzata aħjar.

DAHLA

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 htiġijiet regolatorji preżenti u futuri.
2. Studji dwar tossiċità ta' inalazzjoni subkronika jintużaw primarjament biex ikunu dderivati konċentrazzjonijiet regolatorji għall-valutazzjoni tar-riskju ta' haddiema f'konfigurazzjonijiet okkupazzjonali. Jintużaw ukoll biex ikun ivvalutat riskju residenzjali, ta' trasport u ambjentali għall-bniedem. Dan il-metodu jgħin biex ikunu kkaratterizzati effetti hżiena 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-ghazla ta' konċentrazzjonijiet għal studji kroniċi. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux mahsub speċifikament 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-ghazla ta' konċentrazzjonijiet ta' testijiet adatti tista' tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika, u l-proprjetajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo*; użu/ijiet antiċipati 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' jagħzel li jinkludi evalwazzjonijiet xierqa bħal gaġġa funzjonali ta' osservazzjoni (FOB) u kejl ta' attività motorja. Għalkemm l-ghazla sewwa tal-hin ta' espożizzjonijiet relattivi għal eżamijiet speċifiċi tista' tkun kritika, il-prestazzjoni ta' dawn l-attivitàjiet addizzjonali m'għandhiex tfixxkel id-disinn bażiku tal-istudju.

▼ M4

4. Dilwizzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar korrużivi jew irritanti jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet li għandhom irendu l-grad mixtieq ta' tossiċità. Jekk jogħġbok irreferi għal GD 39 (2) għal aktar informazzjoni. Meta l-annimali jkunu esposti għal dawn il-materjali, il-konċentrazzjonijiet immirati għandhom ikunu baxxi biżżejjed li ma jgħolqux uġiġh kbir u diffikultà, iżda biżżejjed biex jestendu l-kurva ta' konċentrazzjoni-rispons għal livelli li jilhq u 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-hin ta' meta beda (ara l-paragrafi 11-13). Għandha tingħata l-gustifikazzjoni 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-tehd tad-deċiżjoni li jinqatlu annimali moribondi jew li jkunu qed ibatu hafna, u l-gwida biex ikun magħruf meta l-mewt tkun tista' titbassar jew tkun waslet qrib hafna, 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 roditori adulti żgħażaġh f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-ispeċi preferuta hija l-far. Għandha tingħata gustifikazzjoni 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 żgħażaġh li jkunu minn 7 sa 9 ġimgħat fl-età. Il-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' $\pm 20\%$ tal-piż medju għal kull sess. L-annimali jintgħażlu b'mod każwali, jiġi 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 jintuza l-ilma bħala vejjikolu. Qabel u wara l-espożizzjonijiet, l-annimali ġeneralment għandhom jitqieghdu 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 animal u għandu jimminimizza t-telf minhabba kannibalizmu u ġlied. Meta l-annimali jkollhom ikunu esposti mill-imnieher biss, jista' jkun jehtigilhom jidraw it-tubi ta' trazzin. It-tubi ta' trazzin m'għandhomx jimponu tensjoni fiżika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażzin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (ipertermja) u/jew volum respiratorju minusku. 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' trazzin. L-annimali esposti mill-ġisem kollu għal aerosol għandhom jinthalqu individwalment matul l-espożizzjoni biex ma jithallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' shabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċertifikati mil-laboratorju, hlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb municipli. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, bis-sekwenza tkun ta' 12-il siegħa dawl/12-il siegħa dlam.

▼ **M4****Kmamar tal-Inalazzjoni**

9. In-natura tal-kimika għall-ittestjar u l-oġġett tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-modalità ppreferuta ta' espożizzjoni hija mill-innieher biss (liema frazi tinkludi r-ras biss, l-innieher biss, jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-innieher biss hija ġeneralment ippreferuta għal studji ta' aerosols likwidi jew solidi u għal fwar li jista' jikkondensa biex jiffurma l-aerosols. Għanijiet speċjali tal-istudju jistgħu jinkisbu ahjar 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-innieher biss u mill-ġisem kollu u tal-vantaġġi u l-iżvantaġġi partikolari tagħhom huma indirizzati f'GD 39 (2).

STUDJI DWAR IT-TOSSICITÀ**Konċentrazzjonijiet Limitati**

10. B'differenza minn studji akuti, m'hemmx konċentrazzjonijiet ta' limitu ddefiniti fi studji dwar it-tossicità 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-htiega li tinzamm 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 tinghata ġustifikazzjoni jekk ikun meħtieġ li daww il-limiti jinqabzu meta jkunu ttestjati gassijiet jew kimiċi għall-ittestjar volatili hafna (eż. refrigeranti). Il-konċentrazzjoni limitata għandha tislet tossicità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolgot it-tul tal-hajja tagħhom (3).

Studju dwar id-Detezzjoni ta' Firxa

11. Qabel ma jinghata 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 minhabba li mhux limitat għal għażla ta' konċentrazzjonijiet. It-tagħlim li hemm x'wiehed jiehu minn studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jwassal biex studju ewlieni jirnexxi. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista', pereżempju, jipprovi informazzjoni teknika dwar metodi analitiċi, teħid tad-daqs tal-particelli, 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' jagħzel 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 oghla li hija tollerata mingħajr tensjoni bla bżonn għall-annimali u l-parametri li għandhom jikkarakterizzaw bl-ahjar mod it-tossicità ta' kimika għall-ittestjar.
12. Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jikkonsisti f'livell wiehed 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 jidm mill-anqas 5 ijiem u ġeneralment mhux aktar minn 28 jum. Il-motiv għall-għażla ta' konċentrazzjonijiet għall-istudju ewlieni għandu jinghata fir-rapport ta' studju. L-ghan tal-istudju ewlieni huwa li tintwera relazzjoni ta' konċentrazzjoni-rispons ibbażata fuq dak li huwa mistenni li jkun l-aktar punt ta' tmiem sensitiv. Il-konċentrazzjoni baxxa għandha idealment tkun konċentrazzjoni ta' ebda effett ħażin osservat, filwaqt li l-konċentrazzjoni għolja għandha tislet tossicità inekwivoka mingħajr ma tikkawża tensjoni bla bżonn għall-annimali jew tolgot it-tul tal-hajja tagħhom (3).

▼ M4

13. Meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' konċentrazzjoni għall-istudju dwar id-detezzjoni ta' firxa, l-informazzjoni kollha disponibbli għandha titqies li tinkludi relazzjonijiet ta' attività strutturata u dejta għal kimiċi simili (ara l-paragrafu 3). Studju dwar id-detezzjoni ta' firxa jista' jivverifika/jirrifjuta dawk li jitqiesu li jkunu l-punti ta' tmiem l-aktar sensitivi bbażati b'mod mekkaniku, eż. inibizzjoni ta' kolinesterazi b'organofosfati, formazzjoni ta' metemoglobina b'aġenti eritroċitotossici, ormoni tat-tirojde (T3, T4) għal tiroksikanti, proteina, LDH jew newtrofili f'hasil tal-bronkoalveolari għal partikkel li f'it jinhallu li ma jagħmlux hsara 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' vejikoli skont il-htieġa (ara l-paragrafu 18). Id-dejta kollha disponibbli għandha tkun utillizzata bħala għajnuna fl-għażla ta' livelli adatti ta' espożizzjoni, inkluzi r-riżultati ta' studji sistemiċi ta' tossiċità, metabolizmu u kinetika (għandha ssir enfazi partikolari biex ikunu evitati livelli għoljin ta' konċentrazzjoni li jissaturaw proċessi kinetiċi). Kull grupp ta' test ikollu fih 10 roditori rġiel u 10 nisa li jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar għal 6 sigħat kuljum fuq bażi ta' 5 ijiem fil-gimgha għal perjodu ta' 13-il gimgha (l-eżami jdum b'kollox mill-anqas 90 jum). L-annimali jistgħu wkoll ikunu esposti 7 ijiem fil-gimgha (eż. meta l-ittestjar ikun ha l-farmaċewtiċi man-nifs). Jekk ikun magħruf li wiehed 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' roditori minbarra l-firien ikunu esposti mill-innieher 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' espożizzjoni 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 jhallux 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 f'it jew ebda evidenza ta' tossiċità.

Qatliet Interim

16. Jekk ikunu ppjanati qatliet interim, l-għadd ta' annimali f'kull livell ta' konċentrazzjoni għandu jiżdied bl-għadd li jkollhom jinqatlu qabel ma jitlesta l-istudju. Għandu jingħata l-motiv għal użu ta' qatliet interim, u analiżi ta' statistika għandha tagħti spjegazzjoni sewwa tagħhom.

▼ M4

Studju Satellitarju (Riversibbiltà)

17. Studju satellitarju (riversibbiltà) jista' jintuza 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-htieġa (ara l-paragrafu 18).

Annimali tal-Kontroll

18. L-annimali tal-kontroll negattiv (arja) konkurrenti għandhom ikunu mmanigġati b'mod identiku għall-grupp ta' annimali tat-test flief 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 inkluz grupp ta' kontroll ta' vejjikoli, minflok grupp ta' kontroll negattiv (arja). Kull meta jkun possibbli għandu jintuza l-ilma bħala l-vejjikolu. Meta l-ilma jintuza bħala l-vejjikolu, l-annimali ta' kontroll għandhom ikunu esposti għal arja bl-istess umdità relattiva bħal tal-gruppi esposti. L-ghażla 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' jagħzel li juża kemm kontroll negattiv (arja), kif ukoll kontroll ta' vejjikolu, iżda dan għandu jkun skuraġġit hafna Jekk dejta storika turi li vejjikolu ma jkunx tossiku, f'dak il-każ ma jkunx hemm htieġa għal grupp ta' kontroll negattiv (arja) u għandu jintuza 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 jintuza 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 tahlita tagħhom. L-istat fiziku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, mill-konċentrazzjonijiet magħżulin, u/jew mill-forma fizika li x'aktarx hafna 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 oħra. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat li jkunu ġġenerati konċentrazzjonijiet espussivi. 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 tithalla 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' dhahen tal-metall ikunu iżgħar minn dan l-istandard, u partiċelli u fibri ċċarġjati tad-dhahen tal-metall jistgħu jaqbzuh.

▼ **M4****Preparazzjoni tal-Kimika għall-Ittestjar f'Vejjikolu**

21. Idealment, il-kimika għall-ittestjar għandha tigi ttestjata minghajr vejjikolu. Jekk ikun meħtieġ jintuża vejjikolu biex ikunu ġġenerati l-konċentrazzjoni adattata tal-kimika għall-ittestjar u d-daqs tal-particelli, l-ilma għandu jingħata preferenza. Kull darba li kimika għall-ittestjar tinhall f'vejjikolu, l-istabbiltà tagħha għandha tintwera.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJET 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'hin reali tat-konċentrazzjoni atmosferika tat-test (jew stabbiltà temporali) huwa kejl integrali tal-parametri dinamiċi kollha u jipprovdli mezzi indiretti għall-kontroll tal-parametri rilevanti u dinamiċi kollha tal-inalazzjoni. Jekk il-konċentrazzjoni tkun immonitorjata f'hin reali, il-frekwenza tal-kejl ta' flussi ta' arja tista' titnaqqas sa kejl wiehed għal kull espożizzjoni għal kull jum. Għandha tingħata konsiderazzjoni speċjali biex ikun evitat teħid mill-ġdid ta' nifs fil-kmamar għall-immieher biss. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u l-konċentrazzjoni ta' diossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wiehed jemmen li dan l-istandard ma jkunx jista' jitlejhaq, il-konċentrazzjonijiet tal-ossiġenu u tad-diossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu. Jekk il-kejl jiet fl-ewwel jum ta' espożizzjoni juru li dawn il-gassijiet ikunu ta' livelli tajbin, ma jkunux meħtieġa aktar kejl jiet.

Temperatura tal-Kamra u Umdità Relattiva

23. It-temperatura tal-kamra għandha tinżamm għal 22 ± 3 °C. L-umdià relattiva fiż-zona fejn l-annimali jiehdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-immieher biss, kif ukoll mill-ġisem kollu, għandha tkun immonitorjata kontinwament u rreġistrata kull siegħa matul kull espożizzjoni meta jkun possibbli. L-umdià relattiva għandha preferibbilment tinżamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati tahlitiet abbazi ta' ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minhabba 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 ittehdilha l-kampjun tagħha fiż-zona fejn l-annimali jiehdu 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 wiehed 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'hafna komponenti tista'

▼ M4

wkoll tkun iddeterminata b'analizi gravimetrika. Izda din tehtieg 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 mehtiega analizi 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 jissublimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu ngabru bil-metodu magħżul.

26. Għandu jintuża lott wiehed 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 ġeja, izda ma jkunx limitat għaliha: hin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analizi kromatografika ta' gass, jew minn stimuli 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 tinzamm kostanti daqs kemm ikun prattikabbli. Jista' jintuża apparat ta' monitoraġġ f'hin reali, bħal fotometer 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 minhabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew minhabba konċentrazzjonijiet baxxi, kampjun wiehed għal kull perjodu ta' espożizzjoni jkun aċċettabbli. Idealment, dan il-kampjun għandu mbagħad jingabar tul il-perjodu kollu ta' espożizzjoni. Il-kampjuni individwali tal-konċentrazzjoni tal-kamra jistgħu jkollhom devjazzjoni mill-konċentrazzjoni medja tal-kamra b'mhux aktar minn $\pm 10\%$ għall-gassijiet u l-fwar, u b'mhux aktar minn $\pm 20\%$ għall-aerosols likwidi jew solidi. Il-hin biex tinkiseb ekwilibrazzjoni tal-kamra (t_{95}) għandu jkun ikkalkulat u rrapportat. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-hin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata. Din tqis il-hinijiet mehtiega biex jinkisbu l-ekwilibrazzjoni (t_{95}) u d-degradazzjoni tal-kamra. Gwida għal stima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (2).
28. Għal tahlitiet kumplessi hafna li jikkonsistu f'gassijiet/fwar u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imhaddmin minn prodott/ta/mezzi ta' użu finali b'għan speċifiku), kull fażi tista' tagħxi b'mod differenti f'kamra tal-inalazzjoni. Għalhekk għandha tintgħażel mill-anqas sustanza indikatriċi wahda (analita), normalment l-ingredjent prinċipali attiv fit-tahlita, ta' kull fażi (gass/fwar u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun tahlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrappurtata fir-rigward tat-tahlita 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-Particelli

29. Id-distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli tal-aerosols għandha tkun iddeterminata mill-anqas kull gimgħa għal kull livell ta' konċentrazzjoni billi jintuża impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-ghodda ajrudinamika li tagħti d-daqs tal-particelli (APS). Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza tar-rizultati miksubin minn impattur kaskata u mill-istrument alternattiv, f'dak il-każ l-istrument alternattiv ikun jista' jintuża tul l-istudju kollu.

▼ M4

30. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuża flimkien mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-gabra. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi tad-daqs ta' partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi 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-kejljiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jithallew barra. Biex jinżamm trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittiehdu miżuri biex tkun imminimizzata dejta inkonklussiva li tista' twassal għal htieġa ta' ripetizzjoni ta' studju.
31. It-tehid 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 imhallta.

OSSERVAZZJONIJIET

32. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament qabel, matul, u wara l-perjodu ta' espożizzjoni. Jistgħu jkunu indikati osservazzjonijiet aktar ta' spiss skont ir-rispons tal-annimali matul espożizzjoni. Meta l-osservazzjoni tal-annimali tkun imfixkla bl-użu ta' tubi ta' trazzin tal-annimali, bi kmamar għall-ġisem kollu mixghulin hażin, jew b'atmosfera 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-hin 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-ghajnejn, 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, letargija, rqaq u koma. Il-kejl tat-temperaturi tar-rektum jista' jipprovdri evidenza li ssostni bradipnea riflessa jew ipo/ipermija relatati mat-trattament jew l-gheluq. Valutazzjonijiet addizzjonali jistgħu jkunu inkluzi fil-protokoll ta' studju bħal kinetika, monitoraġġ bijoloġiku, funzjoni tal-pulmun, ritenzjoni ta' materjali li f'it jinhallu li jingemghu fit-tessut tal-pulmun u bidliet ta' mġiba.

PIŻIJET TAL-ĠISEM

35. Il-piżijiet tal-annimali individwali għandhom jiġu rreġistrati f'it qabel l-ewwel espożizzjoni (jum 0), u darbtejn fil-ġimgha wara din (pereżempju: nhar ta' Ġimgha u nhar ta' Tnejn biex juru l-irkupru matul tmiem il-ġimgha mingħajr espożizzjoni jew matul intervall tal-hin biex jippermetti valuazzjoni tat-tossiċità sistematika) jew fil-mument tal-mewt jew l-ewtanażja. Jekk ma jkunx hemm effetti fl-ewwel 4 ġimghat, il-piżijiet tal-ġisem jistgħu jitkejlu kull ġimgha għall-bqija tal-istudju. L-annimali satellitarji (riversibbli) (jekk użati) għandhom jibqgħu jintiżnu kull ġimgha tul il-perjodu kollu ta' rkupru. Fi tmiem l-istudju, l-annimali kollha għandhom jintiżnu f'it qabel il-qatla biex tithalla ssir kalkolazzjoni imparzjali ta' proporzjonijiet ta' organi ma' piżijiet tal-ġisem.

KONSUM TA' IKEL U ILMA

36. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel kull ġimgha. Il-konsum tal-ilma wkoll jista' jitkejjel.

▼ M4

PATOLOGIJA KLINIKA

37. Valutazzjonijiet ta' patoloġija klinika għandhom isiru għall-annimali kollha, inklużi annimali ta' kontrolli u satellitarji (riversibbli), meta jinqatlu. L-intervall ta' hin bejn tmiem espożizzjoni u għbir ta' demm għandu jiġi rreġistrat, l-aktar meta l-kostituzzjoni mill-ġdid tal-punt ta' tmiem indirizzat tkun mgħaġġla. It-tehid ta' kampjuni wara tmiem espożizzjoni huwa indikat għal dawg il-parametri b'nofs haġja plażmatika qasira (eż. COHb, CHE, u MetHb).
38. It-Tabella 1 telenka l-parametri ta' patoloġija klinika li ġeneralment ikunu mehtieġa għall-istudji tossikoloġiċi kollha. L-analiżi tal-awrina ma tkunx mehtieġa abbażi ta' rutina, izda tista' ssir meta titqies utli bbażata fuq tossiċità mistennija jew osservata. Id-direttur tal-istudju jista' jagħzel li jivvaluta parametri addizzjonali biex jikkarakterizza aħjar it-tossiċità ta' kimika għall-ittejtjar (eż. kolinesterazi, lipidi, ormoni, bilanċ ta' aċidu/baži, metemoglobina jew korpi ta' Heinz, kinaži tal-kreatina, proporzjon ta' mjelojde/eritrojde, troponini, gassijiet ta' demm arterjali, deidroġenaži lattat, sorbital deidroġenaži, glutamat ta' deidroġenaži u gamma glutamil transpeptidazi).

Tabella 1

Parametri Standard ta' Patoloġija Klinika

Ematoloġija	
Għadd ta' eritrociti	Għadd totali ta' lewkoċiti
Ematokrit	Għadd differenzjali ta' lewkoċiti
Konċentrazzjoni ta' emoglobina	Għadd ta' pjastrini
Emoglobina korpuskulari medja	Potenzjal għal emboliżmu (aġħzel wiehed):
Volum korpuskulari medju	— Hin protrombin
Konċentrazzjoni ta' emoglobina korpuskulari medja	— Hin ta' emboliżmu
Retikuloċiti	— Hin tromboplastin parzjali
Kimika klinika	
Glukożju (*)	Aminotransferazi tal-alanina
Kolesterol totali	Aspartate aminotransferazi
Trigliceridi	Fosfatazi 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	

(*) Minhabba li perjodu ta' sawm fit-tul jista' jintroduċi parzjalità fil-kejl tal-glukożju għall-annimali ttrattati ma' dawg ta' kontroll, id-direttur tal-istudju għandu jiddetermina jekk ikunx sewwa li jsajjem lill-annimali. Jekk jintuża perjodu ta' sawm, dan għandu jkun adattat għall-ispeċi użata; għall-far dan jista' jkun 16-il siegħa (sawm tul il-lejl). Id-determinazzjoni ta' glukożju għas-sawm tista' ssir wara sawm tul il-lejl matul l-aħħar ġimgħa ta' espożizzjoni, jew wara sawm tul il-lejl qabel awtopsja (f'dan l-aħħar każ flimkien mal-parametri patoloġiċi kliniċi l-oħra kollha).

▼ M4

39. Meta jkun hemm evidenza li s-sistema respiratorja inferjuri (jigifieri, 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 jkun 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 deidroġenazi lattat. Parametri oħra li jistgħu jitqiesu huma dawk li jindikaw ħsara lizosomal, fosfolipidożi, fibrożi u infjammazzjoni irritanti jew allergika li tista' tinkludi d-determinazzjoni ta' citokines/kejmokines proinfjammatorji. Il-kejljiet BAL ġeneralment jikkumplementaw ir-riżultati minn eżamijiet ta' istopatoloġija iżda ma jistgħux jehdulkom posthom. Gwida dwar kif isir ħasil tal-pulmuni tinsab f'GD 39 (2).

EŻAMI OFTALMOLOĠIKU

40. BI-uzu ta' oftalmoskopju jew apparat ekwivalenti, eżamijiet oftalmoloġiċi tal-fundus, tal-medja refrattiva, tal-iris u tal-konguntiva għandhom isiru għall-animalli 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-animalli kollha fil-gruppi l-oħra għandhom ikunu eżaminati, inkluż il-grupp satellitarju (riversibbiltà).

PATOLOĠIJA MAKROSKOPIKA U PIŻIJET TA' ORGANI

41. L-animalli kollha tat-test, inklużi dawk li jmutu matul it-test jew li jitnehhew mill-istudju għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-animalli, għandhom ikunu soġġetti għal żvinar shih (jekk ikun jista' jsir) u għal awtopsja makroskopika. Il-hin bejn it-tmiem tal-aħħar espożizzjoni ta' kull animal u meta jinqatel għandu jiġi rreġistrat. Jekk ma tkunx tista' ssir awtopsja minnufih wara li jkun instab animal mejjet, l-animal għandu jitkessaħ (mhux iffriżat) f'temperatura baxxa bizżejjed biex tkun imminimizzata l-awtolizi. L-awtopsja għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopici kollha għandhom jiġu rreġistrati għal kull animal 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 iehor 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 mehtieg minhabba li ċ-ċelloli mill-irqim jistgħu jfixxlu l-evalwazzjoni istopatoloġika. It-tessuti u l-organi għandhom jitqiegħdu f'10 % ta' formalina newtralizzata jew f'fissattiv adattat iehor malli ssir l-awtopsja, u mhux f'anqas minn 24-48 siegħa qabel l-irqim skont il-fissattiv li għandu jintuza.

▼ **M4**

Tabella 2

Organi u Tessuti Ippreservati Matul Awtopsja Makroskopika

Adrenali	Esofagu
Aorta	[Basla tax-xamm]
Mudullun tal-ghadam (u/jew aspirat frisk)	Ovarji
Mohh (inkluzi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellet, u medulla/mezoċefalu)	Frixa
Il-musrana l-ghamja	Paratirojdi
Il-musrana l-hoxna	Nerv periferali (xjatiku jew tibjali, preferibbilment qrib muskolu)
Duwodenu	Pitwitarja
[Epididimi]	Prostata
[Għajnejn (retina, nerv ottiku) u tebqiet l-ghajnejn]	Il-musrana d-dritta
Wirk u l-ghadma tar-rigiel	Glandoli tal-bżieq
Il-bużżeġa tal-marrara (fejn ikun hemm)	Bżieq seminali
[Glandoli ta' Harder]	Ġilda
Qalb	Nerv vertebrali (ċervikali, midtoraċiku u lumbari)
Ileu	Milsa
Jejunum	Sternu
Kliewi	Stonku
[Glandoli tad-dmugħ (straorbitali)]	Snien
Laringi (3 livelli inkluzi l-bażi tal-epiglotta)	Testikoli
Fwied	Timu
Pulmun (id-denduliet kollha f'livell wiehed, inkluzi l-bronki ewlenin)	Tirojdi
Nodi limfatiċi mir-regjun ilarju tal-pulmun, speċjalment għal kimiċi f'particelli għall-ittestjar li f'it jinhallu. Għal eżamijiet u/jew studji aktar fil-fond b'fokus immunoloġiku, jistgħu jitqiesu nodi limfatiċi addizzjonali, eż. dawg mir-regjuni medjastinali, ċervikali/submandibulari u/jew awrikulari.	[Lsien]
Nodi limfatiċi (distali mill-portal ta' dhul)	Trakea (mill-anqas 2 livelli inkluzi taqsima 1 longitudinali tul il-karina u taqsima 1 trasversali)
Glandola mammarja (mara)	[Ureteru]
Muskolu (koxxa)	[Uretra]
Tessuti nażofaringali (mill-anqas 4 livelli; 1 livell biex jinkludi l-kanal nażofaringali u t-Tessut Limfojde b'Assoċjazzjoni Nażali (NALT))	Bużżeġa tal-awrina
	Utru
	Organu mmirat
	Il-leżjonijiet u l-mases kollha kbar

▼ M4

43. Il-pulmuni għandhom jitnehhew intatti, jintiżnu u jiddaħhlu b'fissattivi adatti bi pressjoni ta' 20-30 cm ta' ilma biex ikun żgurat li tinzamm l-istruttura tal-pulmuni (5). Għandhom jingabru taqsimiet għad-denduliet kollha f'livell wiehed, inklużi l-bronki ewlenin, iżda jekk isir il-ħasil tal-pulmuni, id-dendula mhux maħsula għandha titqiegħed fit-taqsimi bi tliet livelli (mhux taqsimiet tas-serje).
44. Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas 4 livelli tat tessuti nażofaringali, li wiehed minnhom għandu jinkludi l-kanal nażofaringali (5) (6) (7) (8) (9) biex jithalla jsir eżami adegwat tal-epitelju mimli qxur, tranżizzjonali (respiratorju mhux vibranti), respiratorju (respiratorju vibranti) u tax-xamm, u tat-tessut limfatiku ta' tisfija (NALT) (10) (11). Għandhom ikunu eżaminati tliet livelli tal-laringi, u wiehed minn dawn il-livelli għandu jinkludi l-bażi tal-epiglotta (12). Għandhom ikunu eżaminati mill-anqas żewġ livelli tat-trakea, inkluża taqsimi waħda longitudinali tul il-karina minn fejn il-bronki estrapulmonari jinqasmu fi tnejn u taqsimi waħda trasversali.

ISTOPATOLOGIJA

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' jagħzel li jagħmel evalwazzjonijiet istopatoloġiċi għal gruppi addizzjonali biex juri rispons ċar ta' konċentrazzjoni. Meta jintuza 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 mikroskopici.

DEJTA U RAPPORTAR

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 klinici 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-hin 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' jintuza kull metodu ta' statistika ġeneralment aċċettat u l-metodi ta' statistika għandhom jintgħażlu matul it-tfassil tal-istudju.

Rapport tat-Test

47. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

- Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta.

▼ **M4**

— Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far; Jistgħu jkunu pprovduti sors u dejta storika, jekk ikunu għal annimali esposti f'kundizzjonijiet simili ta' espożizzjoni, abitazzjoni u sawm.

— Għadd, età u sess tal-annimali.

— Metodu ta' każwalità.

— Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard.

Kimika għall-ittestjar

— Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).

— Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Registru 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 jfjixkilx ir-riżultat tal-istudju;

Kamra tal-inalazzjoni

— Deskrizzjoni dettaljata tal-kamra tal-inalazzjoni inkluż volum u dijametru.

— 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 (imnieher 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 (mnieher biss), jew toqol tal-annimali/kamra (ġisem kollu).

— Hin għall-ekwilibriju tal-kamra tal-inalazzjoni (t95).

— Għadd ta' bidliet fil-volum kull siegħa;

— Apparati ta' metraġġ (jekk applikabbli).

Dejta tal-espożizzjoni

— Motiv għal għażla ta' konċentrazzjoni mmirata fl-istudju ewlieni.

▼ **M4**

- Konċentrazzjonijiet nominali (massa totali tal-kimika għall-ittestjar iġġenerata għal gol-kamra tal-inalazzjoni diviża bil-volum ta' arja li tkun għaddiet mill-kamra).
- Konċentrazzjonijiet attwali tal-kimika għall-ittestjar miġbura miż-zona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal tahlitiet li jipproduċu forom fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament.
- Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrapportati f'unitajiet ta' massa (mg/l mg/m^3 , eċċ.) milli f'unitajiet ta' volum (ppm, ppb, eċċ.).
- Distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli, dijametru ajrudinamiku ta' medjan tal-massa (MMAD), u devjazzjoni ġeometrika standard (σ_g), inkluż il-metodi ta' kalkulazzjoni tagħhom. Analizi waħda għal kull daqs ta' particelli għandha tkun irrappurtata.

Kundizzjonijiet tat-test

- Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kwalunkwe proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs tal-particelli 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 jingabru kampjuni għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tal-kamra u d-distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli.
- Dettalji tal-metodu analitiku kimiku użat u tal-validazzjoni tal-metodu (inkluża l-effiċjenza fl-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-midjum tat-tehid 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-particelli, inklużi dejta ta' ġbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli 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 jfaqqghu u durata tal-effetti).

▼ **M4**

- Tabulazzjoni tal-pizizzjiet individwali ta' kull animal.
- Tabulazzjoni tal-konsum tal-ikel
- Tabulazzjoni ta' dejta ta' patologija klinika
- Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatologiċi għal kull animal, jekk disponibbli.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

- Għandha ssir enfazi partikolari għad-deskrizzjoni tal-metodi użati biex jissodisfaw il-kriterji ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar, eż. il-koncentrazzjoni limitata jew id-daqs tal-particelli.
- Għandu jkun indirizzat jekk jistax ikun hemm respirazzjoni fil-particelli, meqjusin is-sejbiet globali, speċjalment jekk il-kriterji tad-daqs tal-particelli ma setghux jitharsu;
- Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-koncentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni ta' konċentrazzjoni attwali mal-koncentrazzjoni nominali għandhom ikunu inklużi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;
- Il-kawża probabbli tal-mewt u l-modalità predominanti tal-azzjoni (sistemika versus lokali) għandhom ikunu indirizzati.
- Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm hteġa li b'mod uman jinqatlu animali muġugħa jew li jkunu wrew sinjali ta' diffikultà u li jdumu, abbażi tal-kriterji fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar il-Punti ta' Tmiem b'Mod Uman (3).
- L-organu/i mmirat(i) għandu/hom jiġi/u identifikat/i.
- NOAEL u LOAEL għandhom ikunu ddeterminati.

LETTERATURA:

- (1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan E and Redden JC (1994). *Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies*. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). *Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology* (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.

▼ **M4**

- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP u Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers 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 jhassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006 (GU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼ **M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

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

▼ M4

B.30. STUDJI DWAR TOSSICITÀ KRONIKA

DAHLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti ghal-Linja Gwida tat-Test (TG) 452 (2009) tal-OECD. It-TG 452 originali kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.30 rivedut tqies li kien mehtieg 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' revizjonijiet tal-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness: Studji dwar il-Karċinoġenicità u tal-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness, Studji Kombinati dwar Tossicità Kronika/karċinoġenicità, bil-ghan li jinkiseb tagħrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jingħataw aktar dettalji dwar l-ghażla tad-doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgha ta' kimiċi, inkluż pestiċidi u kimiċi industrijali.

2. Il-maġġoranza tal-istudji dwar tossicità kronika jsiru fi speċijiet ta' rodituri, u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, mahsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu mehtieġa 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 Tossicità 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 Tossicità Kronika u Karċinoġenicità (6).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar tossicità kronika huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-ghażla 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-ghażla 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 tossicità kronika. Filwaqt li studji fit-tul dwar tossicità kronika li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu mehtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħha tal-bniedem u/jew jistgħu jkun rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jehtigilhom jiffasslu abbażi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossicità 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-rotta ta' inalazzjoni (6) (7) u dermali (6). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (7), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (10) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼ M4

5. L-istudju dwar tossiċità kronika jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalghu minn espożizzjoni ripetuta tul parti konsiderevoli mill-hajja 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 hażin osservat li tista' tintuża biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfazi wkoll dwar il-htieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi li jixirqu tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.

6. L-ghanijiet 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 hażin 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 jitqies 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-proprietajiet 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-ghanijiet 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 hesrem 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 Karcinoġenicità (15).

▼M4

9. Meta jkun qed isir studju dwar tossiċità kronika, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' gwida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Gwida Nru 19 tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bhala 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 tittiehed 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 tittiehed 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 ha jtaffi l-uġiġh 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'zewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (17) (18). L-istrategija bażika tal-għażla tad-doża tkun tiddependi mill-ghan jew ghanijiet primarji tal-istudju (il-paragrafu 6). Fl-għażla ta' livelli xierqa ta' doża, għandu jinkiseb bilanċ bejn tgharbil ta' perikli minn naha wahda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal dozi baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naha l-oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fis-sitwazzjoni fejn ikollu jsir studju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġeniċità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) (il-paragrafu 11).
11. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir studju kongunt 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 kongunt jipprovi aktar effiċjenza fir-rigward ta' hin u spejjeż imqabblin ma' meta jsiru zewġ studji separati, mingħajr hsara għall-kwalità tad-dejta fil-fażi kronika jew fil-fażi ta' karċinoġeniċità. Izda għandhom jitqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 9 u 20-25) meta jsir studju kongunt 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-aħhar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6).

PRINĊIPJU TAT-TEST

13. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'dozi gradwati lil diversi gruppi ta' annimali għall-esperimenti, normalment għal perjodu ta' 12-il xahar, għalkemm jistgħu jintgħazlu wkoll perjodi itwal jew aqsar skont rekwiżiti regolatorji (ara l-paragrafu 33). Dan il-perjodu jintgħazel li jkun twil biżżejjed biex kull effett ta' tossiċità kumulattiva jsir jidher, mingħajr l-effetti ta' tahwid 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 dermalni jista' wkoll ikun adattat. It-tifsila tal-istudju tista' tinkludi wkoll qatla interim wahda jew aktar, eż. fit-3 jew fis-6 xahar, u jistgħu jkunu inkluzi 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 baqghu ħajjin jinqatlu u ssirilhom awtopsja.

▼ M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla ta' speċi tal-annimali

14. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossiċità kronika f'roditori (ara l-paragrafu 2), għalkemm huwa rikonoxxut li studji simili f'annimali mhux roditori 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 roditori, meta jkunu mehtieġa, 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 Roditori 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' roditori huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' roditori, eż. il-ġurdien. Firien u grieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minhabba l-hajja 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 razzes karatterizzati b'żżejjed. Bħala konsegwenza ta' dawn il-karatteristiċi, hemm ammont kbir ta' informazzjoni dwar il-fizjoloġija u l-patoloġija tagħhom. Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażaġh f'saħħithom ta' razzes li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju dwar tossiċità kronika għandu jkun magħmul f'annimali mill-istess razza u sors bhal dawk użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdm(u) anqas. Innisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-ghalf

16. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gagēg fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni individwali għal kull animal għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (19) (20) (21). Il-gagēg għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minhabba t-tqegħid ta' gagēg. 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-ghalf, 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, inkluzi iżda mhux limitament għal residwi ta' pesticidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestrogeni, 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 inklusa 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 tahlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-ħtiġijiet nutrizzjonali tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rota 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' roditori, 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

▼M4

tal-annimali użati għandha tkun minimali u ma taqbiżx $\pm 20\%$ 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 animal 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.

PROCEDURA

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-reġġa. Għar-roditori għandhom normalment jintużaw mill-anqas 20 animal minn kull sess minn kull grupp f'kull livell ta' doża, filwaqt li għal annimali mhux roditori huwa rrakkomandat minimu ta' 4 minn kull sess minn kull grupp. Fi studji li jinvolvu ġrieden, jistgħu jkunu mehtieġa annimali addizzjonali f'kull grupp ta' doża biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi mehtieġa kollha.

Provvediment għal qatliet interim, gruppi satellitarji u annimali sentinelli

19. L-istudju jista' jagħmel provvedimenti għal qatliet interim (mill-anqas 10 annimali/sess/grupp), eż. kull sitt xhur, biex jagħti informazzjoni dwar il-progressjoni tal-bidliet tossikoloġiċi u informazzjoni mekkanistika, jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament. Fejn diġà jkun hemm informazzjoni bħal din mill-istudji preċedenti ta' tossiċità ta' doża ripetuta dwar il-kimika għall-ittestjar, qatliet interim jistgħu ma jkunux xjentifikament ġustifikati. Gruppi satellitarji jistgħu wkoll ikunu inklużi biex jimmonitorjaw ir-riversibbiltà ta' kull bidla tossikoloġika miġjuba mil-kimika għall-ittestjar li tkun investigata; dawn normalment ikunu ristretti għall-ogħla livell ta' doża tal-istudju flimkien ma' kontroll. Jista' wkoll ikun inkluż grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitorjaġġ ta' stat ta' mard, jekk ikun mehtieġ, matul l-istudju (22). Jekk ikunu pplanati qatliet interim jew li jiddaħhlu gruppi satellitarji jew ta' sentinelli, l-għadd ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jidded bl-għadd skedat ta' annimali 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-kejljiet ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika u investigazzjonijiet patoloġiċi bħall-annimali fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju ewlieni, għalkemm jista' wkoll ikun hemm provvedimenti (fil-gruppi ta' qatliet interim) biex il-kejljiet ikunu ristretti għal mizuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità.

Gruppi ta' doži 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, hlief meta jsir test ta' limitu (ara l-paragrafu 27). Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

▼ **M4**

21. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, normalment għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkunu evitati tbatija, tossiċità severa, morbidità jew mewt. Filwaqt li jitqiesu l-fatturi li l-profil tagħhom jinsab fil-paragrafu 22 hawn taht, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-gisem (madwar 10 %).
22. Izda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-ogħla doża anqas mid-doża* li ttipprovdi evidenza ta' tossiċità, *eż. jekk doża tislet effett avvers ta' thassib izda li madankollu jkollha ftiit impatt fuq il-ħajja jew il-piż tal-gisem. L-ogħladoża m'għandhiex tkun aktar minn 1 000 mg/kg tal-piż tal-gisem/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-ghoti ta' dozi aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-dozi li fihom jistgħu jsejtnu bidliet importanti fil-metabolizmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa.*
24. L-isparjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, izda 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' dozi, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal hafna (*eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10*) bejn dożagġi. 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' dozi fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn dozi esterni u interni jsejtnu jew ma jsejtnux;
 - Leżjonijiet prekursori, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;
 - Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta' modalità ta' azzjoni, bħal dozi li fihom tibda tfaqqa' ċ-ċitotossicità, livelli ta' ormoni jithawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;
 - Reġjuni tal-kurva ta' doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, *eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;*
 - Konsiderazzjoni ta' livelli antiċipati ta' espożizzjoni umana.

▼ M4

26. Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta' kontroll ta' vejjikoli jekk jintuza vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Hlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom ikunu maniġġati b'mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuza 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 jittiehed anqas ikel tad-dieta b'mod sinifikanti minhabba dieta b'anqas palat, grupp ta' kontroll addizzjonali ta' tmigh 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 wahda, 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 shiħ bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jitqisx li jkun mehtieg. Jista' jkun japplika limitu ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem/jum hlief meta espożizzjoni umana tindika l-htieġa li jkollu jintuza livell oġħla ta' doża.

Preparazzjoni ta' doži u amministrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar

28. Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata oralment, permezz tad-dieta jew ilma tax-xorb, jew b'gavage. Informazzjoni addizzjonali dwar rotot u metodi ta' amministrazzjoni hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (6). Ir-rotta u l-metodu ta' amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-ghan tal-istudju, mill-proprietajiet 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. Izda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta' rotot oħra tista' tkun aktar adattata.
29. Meta jkun mehtieg, il-kimika għall-ittestjar tinhall jew tiġi sospiża f'vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u additivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprietajiet 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 jfjixklux 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 wiehed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgha. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

31. Fil-każ ta' amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa), normalment għal perjodu ta' 12-il xahar (ara wkoll il-paragrafu 33), għalkemm jista' jkun mehtieg perjodu itwal skont rekwiżiti regolatorji. Kull reġim iehor ta' dożaġġ, eż. hamest ijiem fil-ġimgħa, jehtieglu 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, izda 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' roditori minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieher biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistghu 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 rqiġ ta' intubazzjoni adattat, f'hinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża wahda darba kuljum, meta pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista' jkun possibbli li tinzamm 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 wiehed 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 roditori (22). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-koncentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistghu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jehtiegihom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f'koncentrazzjonijiet 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 iġġustifikati, l-aktar fil-każ ta' dawh li jdumu anqas. Gruppi satellitarji inkluzi 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, inkluzi 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, inkluzi f' tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. Osservazzjonijiet kliniċi ġenerali għandhom isiru mill-anqas darba kuljum, preferibbilment fl-istess hin(ijiet) kull jum, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta' effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta' amministrazzjoni b'gavage.

▼ M4

35. Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha mill-anqas darba qabel l-ewwel espożizzjoni (biex jithallew isiru paraguni skont is-sugġett), 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 esplicitament 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' sekrezjonijiet u eskrezjonijiet u attività awtonomika (eż. tidmigh, 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 oftalmologiku, 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 ohra jissuggerixxu tossiċità okulari, f'dak il-każ il-frekwenza ta' eżami okulari għandha tizied.
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-smigh, viżivi u proprioċettivi) (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 jintiznu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa, u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejljiet 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 kejljiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

▼ M4

Ematoloġija u bijokimika klinika

40. Fi studji li jinvolvu roditori, 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-hin kollu. Għal grieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha (ara l-paragrafu 18). Fi studji ta' annimali mhux roditori, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'hinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal roditori. Il-kejljiet kull 3 xhur, għal roditori jew għal annimali mhux roditori, jistgħu ma jsirux jekk ma jkunu deħru ebda effetti fuq parametri ematoloġiċi fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Għandhom jittieħdu kampjuni tad-demmi minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardjaku jew minn sinus retroorbitali, b'anestezija.
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), hin protrombin u hin tromboplastin parzjali attivati. Parametri ematoloġiċi oħra bħal korpi ta' Heinz jew morfoloġija atipika oħra ta' eritroċiti jew metemoglobina jistgħu jitkejlu kif jixraq skont it-tossicità 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 effetti 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, speċifikament, ta' effetti fuq il-kliewi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demmi miksubin minn mill-anqas 10 annimali rġiel u 10 nisa għal kull grupp fl-istess intervalli ta' hin kif speċifikat għall-investigazzjonijiet ematoloġiċi, billi jintuża l-istess annimal il-hin kollu. Għal grieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika kollha meħtieġa. Fi studji ta' annimali mhux roditori, jittieħdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'hinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal roditori. Jistgħu ma jsirux kejljiet kull 3 xhur għal roditori jew għal annimali mhux roditori jekk ma jkun deher ebda effetti 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-animalli (bl-eċċezzjoni tal-grieden) 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 (aminotransferazi tal-alanina, aspartate aminotransferazi, glutamat ta' deidroġenazi, aċidi totali tal-bili) (31), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfatazi alkalina, gamma glutamil trasferimentazi, 5'-nukleotidazi, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (31). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliceridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesterazi jistgħu jitkejlu kif jixraq, skont it-tossicità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, hemm meħtieġa ta' approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar.

▼M4

43. Determinazzjonijiet ta' analizi 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 mehtieg isiru kejljiet kull 3 xhur jekk ma jkun deher ebda effett fuq analizi 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 mohbi. Jistgħu jintużaw aktar parametri meta jkun mehtieg biex tkun estiża l-investigazzjoni ta' effett(i) osservat(i).
44. Huwa meqjus b'mod ġenerali li jehtiegu varjabbli bażi ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel trattament għal studji dwar il-klieb, iżda ma jehtiegi l-ohra 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 shiha u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fethiet 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 kejljiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossicità jew immunotossicità (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 jehtiegi l-awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju.
46. Pizijiet ta' organi għandhom jingabru mill-annimali kollha, minbarra dawk esklużi bil-parti tal-ahhar tal-paragrafu 45. L-adrenali, il-mohh, l-epididimi, il-qalb, il-kliewi, il-fwied, l-ovarji, il-milsa, it-testikoli, it-tirojde (jintiznu 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 imwajjal magħhom, kif jixraq, u l-piz tagħhom fl-imxarrab għandu jittiehed malajr kemm jista' jkun wara dissezzjoni biex ma jithalliex 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 mahsub sussegwentement (32) (tessuti f'parentezi 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
mohh (inkluzi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellett, u medulla/mezoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugh (straoritali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]

▼ M4

glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bzieq	trakea
il-musrana l-hoxna	nodi limfatiċi (kemm superficjali kif ukoll fondi)	buzziċċa seminali	buzziċċa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors ghan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod vizibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mniefer, turbinati u sinus paranażali]	gilda	[ureteru]
għajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtorta-ċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-ghaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vagina
buzziċċa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-ghadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-ghadam
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-htieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprietajiet magħrufa tal-kimika għall-ittestjar. Fi studji li jinvolvu r-rotta dermal ta' amministrazzjoni, il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandhom ikunu ppreservati, u t-tehid ta' kampjuni speċifiċi u l-preservazzjoni tal-gilda 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 speċifikament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

48. Hija disponibbli gwida dwar l-ahjar Prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (32). L-eżamijiet istopatoloġiċi minimi għandhom ikunu:

- it-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;
- it-tessuti kollha minn annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;
- it-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi;
- tessuti mmirati jew tessuti li wrew bidliet relatati ma' trattament fil-grupp ta' doża għolja, mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;
- fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu eżaminati.

▼ **M4****DEJTA U RAPPORTAR****Dejta**

49. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. 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 għal raġunijiet umani u l-hin ta' kull mewta jew qatla b'mod uman, l-għadd ta' annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluz iż-żmien meta jibdwew 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-risultati 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-hames snin li jkunu ġew qabel l-istudju inkwistjoni.
51. Meta jkunu applikabbli, risultati numeriċi għandhom ikunu evalwati b'metodu ta' statistika ġeneralment aċċettabbli u adattat. Il-metodi ta' statistika u d-dejta li jkollha tiġi analizzata għandhom jintgħazlu matul it-tfassil tal-istudju (paragrafu 8). L-għażla għandha ttiprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun mehtieġ.

Rapport tat-test

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

Kimika għall-Ittestjar:

- natura fizika, purezza u proprjetajiet fizikokimiċi;
- dejta ta' identifikazzjoni;
- sors tal-kimika;
- numru tal-lott;
- ċertifikat tal-analiżi tal-kimika

Vejjikolu (fejn xieraq):

- ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma).

Annimali tat-test:

- speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;
- għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;

▼ **M4**

- sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;
- piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

- motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;
- meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;
- dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta;
- dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omogeneità tal-preparazzjoni;
- rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
- għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieher jew il-ġisem kollu;
- dozi 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, incidenza (u, jekk bil-punti, severità), u dewmien ta' osservazzjonijiet kliniċi (jekk hux tranżitorji jew permanenti);
- eżami oftalmologiku;
- testijiet ematoloġiċi;
- testijiet ta' bijokimika klinika;
- testijiet ta' analiżi tal-awrina;
- riżultat ta' kull investigazzjoni ta' newrotossiċità jew immunotossiċità
- piż terminali tal-ġisem;
- piżijiet ta' organi (u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli);
- sejbiet minn awtopsji;
- deskrizzjoni dettaljata tat-trattamenti kollha relatati ma' sejbiet istopatoloġiċi;
- dejta ta' assorbiment jekk disponibbli;

▼M4

Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq

Diskussjoni dwar riżultati inkluzi:

- Doża: relazzjonijiet 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'Animali Mhux Rodituri.
- (6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- (7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (8) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 Jum.
- (9) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossiċità tal-Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.
- (10) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossiċità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).
- (11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.
- (12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.
- (13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

- (14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 - 837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Id-Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.
- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) 999-1003 Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.

▼M4

- (30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼ **M4**

Appendix 1

DEFINIZZJONI

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

▼B

B.31. STUDJU TAT-TOSSICITÀ FL-IŻVILUPP PRENATALI

1. METODU

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 414 (2001).

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' l-ittestjar żviluppanti tat-tossicità huwa iddisinjat li jipprovi informazzjoni ġenerali li tikkonċerna l-effetti ta' l-espożizzjoni prenatalifug annimal tqil waqt it-test u fuq l-organizmu żviluppanti in utero; dan jista' jinkludi l-assessjar ta' l-effetti maternali kif ukoll il-mewt, anormalitajiet strutturali, jew it-*tkabbir* mibdul tal-fetu. Id-difetti funzjonali, għalkemm parti importanti fl-iżvilupp, ma humiex parti integrali ta' dan il-metodu tat-test. Dawn jistgħu ikunu ittestjati għal studju separat jew bħala zieda ma dan l-istudju bl-użu tal-metodu tat-test għal newrotossicità ta' l-iżvilupp. Għall-informazzjoni dwar it-testijiet għal deficijenzi funzjonali u l-effetti l-oħrajn ta' wara t-twelid, il-Metodu tat-Test għal studju tat-tossicità riproduttiva ta' żewġ ġenerazzjonijiet u l-istudju għal newrotossicità ta' l-iżvilupp għandu jkun ikkonsultat skond kif xieraq.

Dan il-metodu tat-test jista' jehtieg adattazzjoni speċifika f'każi individwali fuq il-bażi ta' tagħrif speċifiku fuq, eż. il-propjetajiet fizikokimiċi jew tossikoloġiċi tas-sustanza tat-test. Tali adattazzjoni hija aċċettabbli, meta evidenza xjentifika konvinċenti tissuggerixxi li l-adattazzjoni tkun twassal għal test aktar informativ. F'tali każ, din l-evidenza xjentifika għandha tkun dokumentata bir-teqqa fir-rapport ta' l-istudju.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossikoloġija ta' l-iżvilupp: l-istudju ta' l-effetti hżiena fuq l-organizmi ta' l-iżvilupp li jistgħu jirriżultaw mill-espożizzjoni qabel il-konċepiment, matul żvilupp ta' qabel it-twelid, jew ta' wara t-twelid għaž-żmien mal-maturutà sesswali. Il-manifestazzjonijiet maġġuri tat-tossicità ta' l-iżvilupp jinkludu, 1) il-mewt ta' l-organizmu, 2) l-annormalità strutturali, 3) tibdil fit-*tkabbir*, u 4) deficijenza funzjonali. It-tossikoloġija ta' l-iżvilupp kienet preċedentament ta' spiss referuta bħala *teratoloġija*.

Effett hāzin: kwalunkwe alterazzjoni relatata mat-trattament minn linja bażi li tnaqqas l-abbiltà ta' l-organizmu li jibqa hāj, li jirripriduċi jew li jadatta għall-ambjent. Fir-rigward tat-tossoloġija ta' l-iżvilupp, meqjusha fis-sens l-aktar wiesa, din tinkludi kwalunkwe effett li jinterferixxi mal-iżvilupp normali tal-conceptus, kemm qabel u wara t-twelid.

Tkabbir mibdul: Tibdil fl-organu naxxenti jew fil-piż tal-ġisem jew fid-daqs.

Alterazzjonijiet (annormalitajiet): Alterazzjonijiet strutturali fl-iżvilupp li jinkludu kemm il-malformazzjonijiet u wkoll varjazzjonijiet (28).

Malformazzjoni/Annormalità Maġġuri: Tibdil strutturali ikkunsidrat bħala detrimental għall-annimal (jista' wkoll ikunu letali) u hija normalment rari.

▼B

Varjazzjoni/Annormalità Minuri: Tibdil strutturali meqjus bhala li jkollu ftit jew l-ebda effett strutturali fuq l-annimal; jista' jkun temporanju jew jista' jsehh relattivament ta' spiss fil-popolozzjoni tal-kontroll.

Konċepiment: Is-summa tad-derivattivi ta' ovum fertilizzat fi kwalunkwe stadju ta' l-iżvilupp mill-fertilizzazzjoni sat-twelid, inklużi l-membrani extra-embrijoniċi kif ukoll l-embriju jew il-fetu.

Implantazzjoni (nidazzjoni): It-twahhil tal-blastocista ma l-inforra epiteljali ta' l-uteru, inkluż il-penetrazzjoni tagħha mill-epiteljum uterin, u t-twahhil tagħha fil-endometrijum.

Embriju: L-istadju kmieni jew żviluppanti ta' kwalunkwe organizmu, speċjalment l-iżvilupp tal-prodott tal-fertilizzazzjoni tal-bajda wara l-assi t-twila tkun tidher u sakemm l-istrutturi maġġuri kollha jkunu preżenti.

Embijotossicità: Detrimentali għall-istruttura normali, l-iżvilupp, it-tkabbir, u/jew il-viabbilità ta' embrijun.

Fetu: Il-wild mhux imwieled fil-perjodu post-embrijoniku.

Fetutossicità: Detrimentali għall-istruttura normali, l-iżvilupp, it-tkabbir, u/jew il-viabbilità tal-fetu.

Abort: It-twarrib ta' qabel il-waqt mill-uteru tal-prodotti tal-konċepiment: ta' l-embrijun jew ta' fetu mhux-viabbli/

Reżorpzjoni: Konċepiment li, wara li jkun gie impjantant fl-uteru, sussegwentament imut u jkun, jew kien, assorbit mill-gdid.

Reżorpzjoni kmieni: Evidenza ta' l-implant minghajr embrijun/-fetu rikonoxxibbli.

Reżorpzjoni tard: Embrijun jew fetu mejjet b; tibdiliet esterni degenerattivi.

NOAEL: Abbrevjazzjoni għal-livell ta' l-ebda effett avvers ma huwa osservabbli (no-observed-adverse-effect level) u hija l-ghola doza jew livell ta' espożizzjoni meta l-ebda sejbiet avversi realatati mat-trattament ma jkunu osservati.

1.3. SUSTANZA TA' REFERENZA

Xejn.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Normalment, is-sustanzaa tat-test hija somministrata fuq annimali tqal għal mill-anqas mill-impjantazzjoni sa jum wiehed qabel il-jum skedat tal-qatla, li għandu jkun qrib kemm jista' jkun possibbli għall-jum normali tal-hlas minghajr ir-riskju ta' informazzjoni li tirriżulta minn hlas kmieni. Il-metodu tat-test mhux intiz li jeżamina biss il-perjodu ta' lorganogenesi, (eż. il-jiem 5-15 fl-annimal gerriema, u l-jiem 6-18 fil-fenek) imma wkoll l-effettu mill-pre-impjantazzjoni, meta xieraq, mutul il-perjodu kollu tal-ġestjoni sal-jum ta' qabel is-sezzjoni ċesarja. Ftit qabel is-sezzjoni ċesarja, il-femminili jkunu maqtula, il-kontenuti ta l-utru jkunu eżaminati, u l-fetu huma evalwati għan anomalitajiet esterni viżibbli u għal nisġiet rotoġ u tibdiliet skeletali.

▼B**1.5. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST****1.5.1. L-ghażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

Huwa rrakkommandat li t-testijiet ikunu mwettqa fuq l-ispeċje l-aktar relevanti, u li l-ispeċje u r-razzez tal-laboratorju li huma normalment użati fit-testijiet dwar it-tossiċità fl-iżvilupp prenatali, jkunu użati. L-ispeċje ta' l-anniamli gerriema preferuta huja l-far u l-ispeċje ta' annimali mhux ġeggiema huwa l-fenek. Ġustifikazzjoni għandha tkun ipprovduta jekk ikun użat xi speċje ieħor.

1.5.2. Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg u ta' l-ghalf

Il-temperatura tal-kamra ta' fejn jinżammu l-annimali ta' l-esperiment għandha tkun 22 °C ($\pm$ 3o) għall-annimali gerriema u 18 °C ($\pm$ 3°) għall-fniek. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % appart mill-waqt it-tindif tal-kamra, l-ghand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-ghalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

Il-proċeduri ta' l-akkompanjament għandhom jitwettqu f'gaġġeg adatti għal dak l-iskop. Meta gaġġeg separati għall-annimali fl-akkompanjament huma preferuti, iż-żamma ta' numru żgħir f'gagga waħda huwa wkoll aċċettabbli.

1.5.3. Preparazzjoni ta' l-annimali

Annimali b'saħħithom. Li jkunu ġew akklamizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill anqas 5 ijiem u li ma jkunux ġew suġġetti għal proċeduri preċedenti sperimentali, għandhom ikunu użati. L-annimali tat-test għandhom ikunu karatterizzati b'hala speċje, razza, sorsi, seww, piż u/jew l-età. L-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom, kemm jista' jkun prattikabbli, ikunu ta' piż u età uniformi. Femmini adulti żgħażaġh li jkunu għadu ma weldux għandhom ikunu użati f'kull livell ta' doża. Il-femminili għandhom ikunu mghammra ma maskili ta' l-istess speċje u razza, u t-tghammir ma l-ulied għandu jkun evitat. Għall-annimali gerriema, il-jum 0 tal-gestazzjoni huwa l-jum li fih il-buq vaginali u/jew l-isperma huma osservati; għall-fniek il-jum 0 huwa normalment il-jum tal-coitus jew ta' l-inseminazzjoni artifiċjali, jekk tkun użata dik it-teknika. In-nisa mghammra għandhom ikunu assenjati b'mod mingħajr preġudizzju lejn gruppi tal-kontroll u t-trattament. Il-gaġġeg għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minhabba t-tqeghid fil-gaġġeg ikunu minimizzati. Kull animal għandu jkun assenjat numru uniku ta' l-identifikazzjoni. In-nisa mghammra għandhom ikunu assenjati b'maniera mingħajr preġudizzju lejn il-gruppi ta' kontroll u tat-trattament, u jekk in-nisa jkunu mghammra flottijiet, l-annimali ta' kull lott għandhom ikunu imqassma b'mod egwali matul il-gruppi. Bl-istess mod, in-nisa seminati mill-istess raġel għandhom ikunu mqassma b'mod egwali matul il-gruppi.

1.6. PROCEDURA**1.6.1. In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Kull grupp tat-test u tal-kontroll għandu jinkludi numru suffiċjenti ta' femminili li jirriżulta f'madwar 20 animal femmini bis-sita ta' l-implantazzjoni fin-nekropsija. Gruppi ta' anqas minn 16 il-animal bis-sita ta' l-implantazzjoni jista' ma jkunx xieraq. Il-mortalità materna mhux neċessarjament tinvalida l-istudju, basta li din ma tkunx teċċedi madwar 10 %.

▼B**1.6.2. Preparazzjoni tad-doži**

Jekk il-mezz jew l-adittiv l-iehor ikun użat sabiex jiffaċilita d-doża, kunsiderazzjoni għandha tkun mogħtija għal dawn il-karatteristiċi li ġejjin: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu jgħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ima jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali. Il-mezza la għandu jkun żviluppatament tossiku u l-anqas li jkollu effetti fuq ir-riproduzzjoni.

1.6.3. Id-Doża

Normalment, is-sustanza tat-test għandha tkun somministrata ta' kull jum mill-impjantazzjoni (eż. il-jum 5 minn wara t-tgħammir) sal jum ta' qabel is-sezzjoni neċessarju kif skedata. Jekk l-istudji preliminari, meta disponibbli, ma jkunux jindikaw potenzjal għoli dwar it-telf pre-impjantazzjoni, it-trattament jista' jkun estiz li jinkludi l-perjodu intier tal-gestjoni, mit-tgħamir sal-jum ta' qabel il-qatla skedata. Huwa ben magħruf li tqandil mhux sewwa jew xi tahbit matul it-tqala jista' jirriżulta ftelf prenatali. Sabiex ikun hemm harsien kontra t-telf prenatali minn fatturi li ma humiex relatati mat-trattament, tqandil bla hteġa ta' annimali tqal kif ukoll tahbit minn fatturi barranija bħal ma huma l-hsejjes għandhom ikunu evitati.

Mill-anqas tlett livelli ta' doži u l-kontroll simultanju għandhom ikunu użati. Annimali b'saħħithom għandhom ikunu aassenjati b'mod mingħajr preġudizju lejn gruppi tal-kontroll u t-trattament. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu mqassma sabiex jipproduċu l-effetti tossiċi tal-grad tat-tossiċità. Sakemm ma jkunx hemm limitazzjoni tal-propjetajiet tan-natura fiżika/limika jew bioloġika tas-sustanza tat-test, l-għola doża għandha tkun magħzula bil-ghan li jkunu introdotti xi tossiċità ta' l-iżvilupp u/jew materna (sinjali kliniċi jew tnaqqis fil-piż tal-ġisem) imma mhux mewt jew sofferenza akuta. Mill-anqas livell ta' doża wahda intermedja għandu jipproduċi effetti tossiċi minimi osservati. Il-livell l-aktyar baxx m'għandux jipproduċi xi evidenza la ta' tossiċità materna u l-anqas ta' l-iżvilupp. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħzulha bil-ghan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett hażin mhu osservat (NOAEL). Tnejn- sa erba intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-doži. Għalkemm l-istebbeliment tal-NOAEL materni huwa l-ghan, l-istudji li ma jista' b-bilixxux tali livell jistgħu wkoll ikunu aċċettabbli 91).

Livelli ta' doži għandhom ikunu magħzula billi tkun meqjusa xi informazzjoni eżistenti kif ukoll l-informazzjoni addizzjonali dwar il-metabolizmu u t-tossikukinetiċi tas-sustanza tat-test jew tal-materjali relatati. Din l-informazzjoni għandha wkoll tgħin fid-demonstrazzjoni ta' l-adekwatezza ta' l-amministrazzjoni tad-dożar.

Grupp ta' kontroll konkorrenti għandu jkun użat. Dan il-grupp għandu jkun grupp ta' kontroll ittrattat taparsi jew mezz ta' grupp ta' kontroll jekk mezz ikun użat fl-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-gruppi kollha għandhom ikunu amministrati l-istess volum jew tas-sustanza tat-test jew tal-mezz. L-annimali fil-grupp(i) tal-kontroll għandhom ikunu mqandla bl-istess manjiera bħal l-annimali fil-grupp tat-test. Il-gruppi bil-mezz ta' kontroll għandhom jirċievu l-mezz fl-għola ammont użat (bħal fil-gruppi ta' l-anqas trattament).

▼B**1.6.4. Test tal-limitu**

Jekk test f'doża ta' livell wiehed ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-gisem/jum b'amministrazzjoni orali. Li jutilizza l-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma tipproduċi leba tossiċità osservabbli la fl-annimali tqal u l-anqas fil-proġenji tagħhom u jekk effett ma jkunx mistenni kif ibbażat fuq l-informazzjoni eżistenti (eż. minn tahlitiet strutturament u/jew metabolakament relatati), allura studju shih bl-użu ta' dozi fi tlett livelli għandu mnejn ikunu ikkonsidrat bħala mhux mehtieg. L-isposizzjoni umana mistennija tista' tindika il-htieġa għal-livell ta' doża orali għola li tkun użata fit-test tal-limitu. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma huwa t-tehid man-nifs jew l-applikazzjoni dermali, il-propjetajiet fiżikukimici tas-sustanza tat-test ta' spiss jistgħu jindikaw u jillimitaw il-massimu tal-livell attenibbli għall-espożizzjoni (per eżempju, l-applikazzjoni dermali m'għandhiex tohloq tossiċità lokali severa).

1.6.5. Amministrazzjoni tad-doži

Is-sustanza tat-test jew il-mezz normalment huwa amministrat bi intubazzjoni orali. Jekk tkun użata rotta oħra ta' l-amministrazzjoni, min jagħmel it-test għandu jipprovdi ġustifikazzjoni u raġjonar għal dik l-għażla, u modifiki xierqa jistgħu li jkunu mehtieġa (2) (3) (4). Is-sustanza tat-test għandha tkun somministrata bejn wiehed u iehor fl-istess hin ta' kull jum.

Id-doża lil annimali individwali għandha normalment tkun ibbażata fuq id-determinazzjoni tal-piż tal-gisem kif l-aktar riċenti disponibbli. B'dana kollu, attenzjoni għandha tkun eżerċitata meta tkun aġġustata d-doża ma tul l-aħħar parti tremestra tat-tqala. Informazzjoni eżistenti għandha tkun użata għall-għażla tad-doża sabiex tipprevjeni eċċess tat-tossiċità materna. B'dana kollu, jekk eċċess ta' tissiċità jkun innutat fin-nisa ittrattati, daww l-annimali għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk. Jekk diveri annimali tqal juru sinjali ta' tossiċità eċċessiva, kunsiderazzjoni għandha tingħata għat-terminazzjoni ta' dak il-grupp fid-doża. Jekk is-sustanza tkun somministrata b'ikel sfurzat, dan għandu preferibbilment ikun mogħti bħala doża wahda lill-annimali bl-użu ta' tubu lejn l-istinku jew xi canula ta' l-intubazzjoni xierqa. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wiehed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux jeċċedi 1 ml/100 g piż tal-gisem, apparti fil-każ ta' tahlitiet akweji meta 2 ml/100 g piż tal-gisem jista' jkun użat. Meta jkun użat iż-żejt tal-qamh-ir-rum, il-volum m'għandux jeċċedi 0,4 ml/100 g piż tal-gisem. Varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjonijiet sabiex ikun assigurat volum kostanti matul il-livelli kollha tad-doži.

1.6.6. Osservazzjoni tan-nisa

Osservazzjonijiet kliniċi għandhom jitwettqu u jkunu rreġistrati mill-anqas darba kull jum, preferibbilment fl-istess hin(ijiet) billi jkun ikkonsidrat il-perjodu l-aktar probabbli ta' l-effetti antiċipati ta' wara d-doża. Il-kundizzjoni ta' l-annimali għandha tkun irreġistrata, inkluża l-mortalità, l-għafja tal-mewt, tibdil pertinenti fl-imġieba, u s-sinjali kollha ta' tossiċità barranija.

1.6.7. Il-piż tal-gisem u l-konsum ta' l-ikel

L-annimali għandhom ikunu miżuna fil-jum 0 tal-ġestazzjoni jew mhux aktar tard mill-jum 3 tal-ġestazzjoni jekk annimali mġhammra skond iż-żmien huma fornuti min fekundament barrani, fl-ewwel jum tad-dpża, mill-anqas kull 3 ijiem matul il-perjodu tad-doża u fil-jum tal-mewt kif skedata.

▼B

Il-konsum ta' l-ikel għandu jkun irregolat f'intervalli ta' tlett ijiem u għandu jkun jikkonċidi mal-jiem tad-determinazzjoni tal-piż tal-gisem.

1.6.8. **Eżaminazzjoni ta' wara l-mewt**

In-nisa għandhom ikunu maqtula jum qabel il-jum mistenni tal-ħlas. Femminili li juri sinjali ta' abort jew ħlas prematur għall-iskeda tal-qatla għandhom ikunu maqtula u suġġetti għal eżaminazzjoni makroskopika bir-reqqa.

Filwaqt tat-terminazzjoni jew tal-mewt matul l-istudju, il-mara tqila għandha tkun eżaminata b'makroskopiki għal xi annormalitajiet strutturali jew tibdilied patoloġiċi. L-evalwazzjoni tan-nisa matul is-sezzjon ċesarja u l-analiżi sussegwenti tal-fetu għandha tkun imwettqa, preferibbilment, mingħajr tagħrif dwar il-grupp tat-trattament, sabiex jitnaqqas il-preġudizzju.

1.6.9. **L-eżami tal-kontenuti uterini**

Immedjetament wara t-terminazzjoni jew malli jkun possibbli wara l-mewt, l-uteri għandhom ikunu mneħħija u l-istat tat-tqala ta' l-animall aċċertat. L-uteri li jidhru mhux bit-tqala għandhom ikunu aktar eżaminati (eż. bit-tiċpis bis-sulfid ta' l-ammonju għall-animall gerriema u t-tiċpis Salewski jew b'metodu alternattiv xieraq għall-fniek) sabiex ikun konfermat l-istatus mhux tat-tqala (5).

Uteri tqal jinkludu l-ghonq ta' l-uteri għandhom ikunu miżuna. Il-piżijiet ta' l-uteri tqal m'għandhomx ikunu akkwistati minn animall misjuba mejta waqt l-istudju.

In-numru ta' corpora lutea għandu jkun determinat għall-animall tqal.

Il-kontenuti ta' l-uteri għandhom ikunu eżaminati għan-numru ta' embrijuni jew imwiet tal-feti jew feti viabbli. Il-grad ta' riassorbazzjoni għandu jkun deskritt sabiex ikun ikkalkolat il-ġin relattiv tal-mewt tal-conceptus (ara s-sezzjoni 1.2).

1.6.10. **L-eżami tal-feti**

Is-sess u l-piż tal-ġisem ta' kull fetu għandhom ikunu determinati.

Kull fetu għandu jkun eżaminat għal tibdiliet esterni (6).

Il-feti għandhom ikunu eżaminati għal tibdiliet skeletali u tal-partijiet rotob (eż. varjazzjonijiet u maformazzjonijiet jew anomaliji) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kategorizzazzjoni ta' l-alterazzjonijiet tal-feti hija preferibbli imma mhux meħtieġa. Meta ssir il-kategorizzazzjoni, il-kriterja għad-definizzjoni ta' kull kategorija għandha tkun kjarament mistqarra. Attenzjoni partikolari għandha tingħata għall-passaġġ riproduttiv li għandu jkun eżaminat għal sinjali ta' żvilupp mibdul.

Għall-animall gerriema, madwar nofs kull lott tal-feti għandu jkun ippreparat u eżaminat għal tibdil skeletali. Il-kumpliment għandu jkun preparat u eżaminat għal tibdil fil-partijiet rotob, bl-użu ta' metodi aċċettati u xierqa b'sezzjonament serjali jew b'teknika bil-għaqal ta' dissessjoni grossa.

▼B

Għall-annimali mhux gerriema, eż. fniek, il-feti kollha għandhom ikunu eżaminati kemm għall-partijiet rotob u wkoll għal alterazzjonijiet skeletali. L-iġsma ta' dawn il-feti huma evalwati b'dissessjoni galbata għal tibdil fil-partijiet rotob, li jistgħu jinkludu proċeduri għal aktar evalwazzjoni ta' l-istruttura kardijaka interna (25). Ir-rjus ta' nofs il-heti eżaminati b'dan il-mod għandhom ikunu mnehhija u ipproċessati għal evalwazzjoni ta' alterazzjonijiet fil-partijiet rotob (inkluzi l-ghajnejn, il-mohh, il-passaġġi nażali u l-ilsien), l-użu ta' metodi normali ta' sezzjonar serjali (26) jew metodu egwalment sensittiv. L-iġsma ta' dawn il-feti u l-kumplement tal-feti intatti għandhom ikunu ipproċessati u eżaminati għal tibdil skeletali, bl-utilizzazzjoni ta' l-istess metodi kif deskritti għall-annimali gerriema.

2. DATA

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Id-dettalji għandhom ikunu irrapurati individwalment għan-nisa kif ukoll għall-wild tagħhom u miġbura b'sommarju f'għamla tabulari, li juru għal kull grupp tat-test u għal kull generazzjoni, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-hin ta' xi mewt jew qtil umanitarju, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità kif osservati, inkluz il-hin ta' meta tkun skoppjat, it-tul ta' żmien, u s-severità ta' xi effetti tossiċi, it-tiġ ta' l-osservazzjonijiet ta' l-embrijuni/feti, u l-informazzjoni l-oħra kollha dwar it-traabi l-oħrajn.

Riżultati numerici għandhom ikun evalwati b'metodu statistiku xieraq bl-użu tal-grupp ta' wild bħala unità tad-dettalji għall-analiżi. Metodu statistiku ġeneralment aċċettabbli għandu jkun użat, il-metodi statistici għandhom ikunu magħżula bħala parti mid-disinn għall-istudju u għandhom ikunu ġġustifikati. L-informazzjoni mill-annimali li jmutu qabel il-qtil skedat għandha wkoll tkun irrapurtata. Dik l-informazzjoni tista' tkun inklusa fil-mezzi tal-grupp meta rilevanti. Relevanza mid-dettalji akkwistati minn tali annimali, u għalhekk l-inkluzjoni jew l-eskluzjoni minn xi mess ta' grupp(i), għandha tkun iġġustifikata u iġġudikata fuq bażi individwali.

2.2. EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' l-istudju tat-Tossiċità fl-Iżvilupp Prenatali għandhom ikunu evalwati f'termini ta' l-effetti osservati. L-evalwazzjoni għandha tinkludi din l-informazzjoni li ġejja:

- riżultati tat-test materni u tal-embriju/fetu, inklusa l-avalwazzjoni tar-relazzjoni, jew tan-nuqqas tagħha, bejn l-espozizzjoni ta' l-annimali għas-sustanza tat-test u l-inċidenza u s-severità tas-sejbiet kollha;
- ktiterja użata għall-kategorizzazzjoni esterna tal-fetu, il-partijiet rotob, u l-alterazzjonijiet skeletali, jekk il-kategorizzazzjoni tkun sehhet;

▼B

- meta xieraq, id-dettalji stpriċi tal-kontroll sabiex iqawwu l-interpretazzjoni tar-riżultati ta' l-istudju;
- in-numri użati fil-kalkolu tal-persentaġġi kollha jew ta' l-indiċi;
- analiżi statistika adegwata tas-sejbiet ta' l-istudju, meta xieraq, li għandha tinkludi informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' l-analiżi, sabiex riveditur/statistiku indipendenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid jew jerga jibni l-analiżi.

Fi kwalunkwe studju li juri n-nuqqas ta' xi effetti tossiċi, aktar investigazzjonijiet sabiex tkun stabbilita l-assorbazzjoni u l-biodisponabbiltà tas-sustanza tat-test għandhom ikunu meqjusa.

2.3 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Studju tat-tossiċità fl-iżvilupp prenatali jkun jipprovdni informazzjoni dwar l-effetti ta' espożizzjoni repetuta lejn sustanza matul it-tqala, fuq in-nisa, u l-iżvilupp intra-utru tal-wild tagħhom. Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu interpretati b'konnessjoni mas-sejbier mill-istudji subkroniku, riproduttivi, tossikokinetiċi u studji oħrajn. La darba l-enfasi tkun kemm fuq it-tossiċità enerjali f'termini ta' tossiċità materna u wkoll fuq it-tossiċità fl-iżvilupp fil-ghan finali, ir-riżultati ta' l-istudju jkunu jippermettu sa ċertu limitu għal diskriminazzjoni bejn l-effetti ta' l-iżvilupp li jsehhu fin-nuqqas ta' tossiċità ġenerali u dawk li huma imdahhla biss f'livelli li huma wkoll tossiċi għall-annimal matern (27).

3. RAPPORTAĠĠ

3.1. RAPPORT TAT-TEST

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

Is-sustanza tat-test:

- in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;
- l-identifikazzjoni, inklud in-numru CAS jekk magħruf/stabbilit;
- purità.

Mezz (jekk applikabbli):

- ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

- speċje u t-tipi użati;
- in-numru u l-età ta' l-annimali;
- is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc;
- il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

- ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;
- dettalji dwar is-sustanza tat-test, fomulazzjoni/preparazzjoni tad-dieta, il-koncentrazzjoni akkwistata, l-istabbiltà u l-omoġenità tal-preparazzjoni;

▼B

- dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;
- skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali 9mg/kg il-piż tal-gisem/jum), jekk applikabbli;
- kundizzjonijiet ambjentali;
- dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Riżultati:

Dettalji tar-reazzjoni tossika materna bid-doża, li tinkludi, imma mhux limitata għal:-

- in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali li jkunu baqgħu hajjin, in-numru ta' nisa tqal, u n-numru ta' aborti, in-numru ta' annimali li jweldu kmieni;
- il-jum tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali jkunux baqgħu hajjin sakem maqtula;
- dettalji mill-annimali li ma jkunux baqgħu hajjin tal-qtil skedat għandu jkun irrapurtat imma mhux inkluż fil-paraguni statistiċi inter-grupp;
- il-jum ta' l-osservazzjoni ta' kull sinjal annormali kliniku u l-korsa sussegwenti tiegħu;
- il-piż tal-gisem, tibdil fil-piż tal-gisem u l-piż ta' l-utru bil-hobla, inkluż, b'mod volontarju, it-tibdil fil-piż tal-giesm korregut għall-piż ta' l-utru bil-hobla;
- il-konsum ta' l-ikel u, jekk imkejjel, il-konsum ta' l-ilma;
- is-sejbiet tan-nekopsija, inkluż il-piż ta' l-utru;
- NOAEL valuri għall-effetti materni u ta' l-iżvilupp għandhom ikunu irraportati.

L-għanijiet finali ta' l-iżvilupp bid-doża għal grupp ta' frieħ bl-impjanti, inklużi:

- in-numru ta' corpora lutea;
- in-numru ta' implantazzjonijiet, in-numru u l-persentaġġ ta' feti hajjin u mejta u r- reassorbazzjonijiet;
- in-numru l-persentaġġ ta' telf pre- u post-implantazzjoni.

L-għanijiet finali ta' l-iżvilupp bid-doża għal grupp ta' frieħ b'feti hajjin, inklużi:

- in-numru u l-persentaġġ ta' frieħ hajjin;
- relattività tas-sess;
- il-piż tal-gisem tal-fetu, preferibbilment bis-sess u bis-sessi flimkien;
- alterazzjonijiet esterni, partijiet rotob, u malformazzjoni skeletal u alterazzjoni rilevanti oħrajn;
- kriterja għall-kategorizzazzjoni jekk xierqa;

▼B

— in-numru totali u l-persentaġġ ta' feti u frieħ b'xi alterazzjoni esterna, partijiet rotob jew skeletali, kif ukoll it-tipi u l-inċidenzi ta' anomaliji individwali u alterazzjonijiet oħrajn rilevanti.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4.

REFERENZI

- (1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.
- (2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.
- (3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
- (6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.
- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381-391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398-408.
- (14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.
- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163-173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292.'

▼M4

B.32. STUDJI DWAR IL-KARĊINOĠENIĊITÀ

DAHLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti ghal-Linja Gwida tat-Test (TG) 451 (2009) tal-OECD. It-TG 451 originali dwar Studji dwar il-Karċinoġenicità kienet adottata fl-1981. L-iżvilupp ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 rivedut tqis li kien mehtieg 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 tossicità kronika, u tal-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness: Studji dwar Tossicità Kronika Kongunta/Karċinoġenicità, u bil-ghan li jinkiseb taghrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jinghataw aktar dettalji dwar għażla ta' doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32 huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inkluzi pestiċidi u kimiċi industrijali. Għandu jkun innutat iżda li xi dettalji u rekwiżiti jistgħu jkunu differenti għal farmaċewtiċi (ara l-Gwida SIB tal-Konferenza Internazzjonali għall-Armonizzazzjoni (ICH) dwar Ittestjar għall-Karċinoġenicità ta' Farmaċewtiċi).
2. Il-magġoranza tal-istudji dwar il-karċinoġenicità isiru fi speċijiet ta' rodituri, u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, mahsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu mehtieġa 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 Tossicità 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 Tossicità Kronika u Karċinoġenicità (7).
3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar il-Karċinoġenicità 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-karċinoġenicità. Filwaqt li studji dwar il-Karċinoġenicità li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu mehtieġa 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 jehtigilhom jifasslu abbazi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni tal-karċinoġenicità b'amministrazzjoni orali jista' jiffirma 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-rotta 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' testjar magħmul bir-rotta dermali.

▼ M4

5. L-istudju tal-karċinogeniċità jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalghu 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 karċinogeniċità 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' karċinogeni mhux ġenotossiċi, għal risponsi għal tumuri, li jistgħu jintużaw biex ikunu stabbiliti kriterji ta' sikurezza għal espożizzjoni umana. Qed issir enfazi wkoll dwar il-ħtieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi sewwa tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.
6. L-għanijiet ta' studji dwar il-karċinogeniċità koperti minn dan il-Metodu ta' Ttestjar jinkludu:
 - L-identifikazzjoni tal-proprjetajiet karċinogeniċi 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' karċinogeniċità;
 - 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 karċinogeniċi 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' karċinogeniċità 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 karċinogeniku u biex l-użu ta' annimali jkun mill-anqas. Informazzjoni dwar, u konsiderazzjoni tal-modalità ta' azzjoni ta' karċinogeni suspettat (2) (7) (12) (13) (14) (15) hija partikolarment importanti, minhabba li l-aħjar disinn jista' tkun differenti skont jekk il-kimika għall-ittestjar tkunx karċinogeni 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, karċinogeniċità u dejta tossikoloġika oħra dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża wahda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun disponibbli) u dejta derivata minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Valutazzjoni tal-karċinogeniċità għandha ssir wara li tkun inkisbet informazzjoni inizjali dwar tossiċità minn doża ripetuta għal 28 jum u/jew minn

▼ M4

- testijiet ta' tossiċità għal 90 jum. Testijiet għal żmien qasir ta' bidu-promozzjoni ta' kanċer jistgħu wkoll jipprovdu informazzjoni utli. Approċċ ta' testjar f'fażijiet għall- ittestjar tal-karċinoġenicità għandu jittqies 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 jittqiesu 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 hesrem ta' grupp wiehed 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 karċinoġenicità (20).
10. Fit-tmexxija ta' studju tal-karċinoġenicità, 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 tittiehed 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 tittiehed 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 ha jtaffi l-uġigh 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 karċinoġenicità tinsab fi Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), kif ukoll f'zewġ 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 naha wahda u karatterizzazzjoni ta' risponsi għal doži baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naha ohra. Dan huwa partikolarment rilevanti fis-sitwazzjoni fejn ikollu jsir studju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġenicità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness) (paragrafu 12).
12. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir studju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġenicità (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-karċinoġenicità (dan il-Metodu ta' Ttestjar B.32). It-test kongunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' hin u spejjeż imqabblin ma' meta jsiru zewġ studji separati, mingħajr ħsara għall-kwalità tad-dejta fil-fażi kronika jew fil-fażi ta' karċinoġenicità. Izda għandhom jittqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 11 u 22-25) meta jsir studju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġenicità (il-Kapitolu B.33 ta' dan l-Anness), u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji.

▼ **M4**

13. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. Il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'dożi gradwati lil diversi gruppi ta' annimali tat-test għall-parti l-kbira tal-hajja 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' lezjonijiet neoplastiċi. L-annimali li jmutu jew li jinqatlu matul it-test issirihom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqghu hajjin jinqatlu u ssirihom awtopsja.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Għażla ta' speċi tal-annimal**

15. Dan il-Metodu ta' Ttestjar primarjament ikopri l-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' karċinoġenicità f'roditori (paragrafu 2). L-użu ta' speċijiet ta' annimali mhux roditori jista' jitleqq 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' roditori huwa l-far, għalkemm jistgħu jintużaw speċijiet oħra ta' roditori, eż. il-ġurdien. Għalkemm l-użu tal-ġurdien f'ittestjar tal-karċinoġenicità jista' jkollu utilità limitata (24) (25) (26), skont xi programmi regolatorji preżenti l-ittestjar tal-karċinoġenicità 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 minhabba l-hajja 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-fizjoloġija 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 żgħira f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju tal-karċinoġenicità 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 jipprezentaw 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 jitqieghdu f'gagēg fi gruppi żgħira tal-istess sess; abitazzjoni għal kull annimal wahdu għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (27) (28) (29). Gagēg għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minhabba t-tqeghid ta' gagēg. 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-dietta għandha tissodisfa l-htigijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dietta, inklużi iżda mhux limitatament għal residwi ta' pesticidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestrogeni, metalli tqal u mikotossini, li jistgħu jinfluenzaw ir-riżultat tat-test, għandu jkun baxx kemm jista' jkun. Informazzjoni

▼ M4

analitika dwar il-livelli ta' kontaminanti tan-nutrijent u tad-dieta għandha tkun iġġenerata perġodikament, mill-anqas fil-bidu tal-istudju u meta jkun hemm bidla fil-lott użat, u għandha tkun inkluzi 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-htieġa li tkun żgurata taħlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-htieġijiet nutrizzjonali 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-dożagġ 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 $\pm 20\%$ 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-reġa 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 tizzied il-qawwa ta' statistika tal-istimi ewlenin billi annimali jkunu allokat i 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'dozi baxxi. Iżda għandu jkun irrikonoxxut li zieda moderata fid-daqs ta' grupp għandha tipprovi relattivament ftit zieda 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).

Provdiment għal qatliet interim u gruppi satellitarji (sentinelli)

20. L-istudju jista' jipprovi 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 inkluzi 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 inkluzi fit-tifsila tal-istudju għandu jiżdied bl-għadd skedat ta' annimali li jkollhom jinqatlu qabel ma jitesta l-istudju. Jista' wkoll ikun inkluz grupp addizzjonali ta' annimali sentinelli (tipikament 5 annimali għal kull sess) għall-monitoraġġ tal-istatus ta' mard, jekk ikun meħtieġ, matul l-istudju (30). Gwida ulterjuri hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

▼ M4

Gruppi ta' doži u dożaġġ

21. Gwida dwar l-aspetti kollha ta' għażla ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Mill-anqas għandhom jintużaw tliet livelli ta' doża u kontroll konkurrenti. Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

22. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, għandu jintgħażel l-ogħla livell ta' doża biex ikunu identifikati l-organi prinċipali u l-effetti tossiċi filwaqt li jkun evitati tbatija, tossiċità severa, morbidità jew mewt. Filwaqt li jitqiesu l-fatturi li l-profil tagħhom jinsab fil-paragrafu 23 hawn taht, 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 %). Izda, 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' thassib izda li madankollu jkollha fitt impatt fuq il-hajja 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 mahsub iehor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 25) fil-livell ta' doża l-aktar baxx. Fatturi li għandhom jitqiesu fl-ghoti ta' doži aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-doži li fihom jistgħu jsehhu bidliet importanti fil-metabolizmu jew il-modalità ta' azzjoni tossika, fejn ikun mistenni limitu, jew fejn ikun mistenni punt ta' tluq għal estrapolazzjoni ta' doża baxxa.

24. L-isparjar magħżul ta' livelli ta' doża jkun jiddependi mill-karatteristiċi tal-kimika għall-ittestjar, u ma jistax ikun preskritt f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, izda intervalli ta' darbtejn jew erba' darbiet ta' spiss jipprovdu prestazzjoni tajba ta' test biex ikunu stabbiliti l-livelli minn fuq għal isfel ta' doži, u ż-żieda tar-raba' grupp ta' test sikwit hija preferibbli mill-użu ta' intervalli twal hafna (eż. aktar minn fattur ta' madwar 6-10) bejn dożaġġi. B'mod ġenerali, l-użu ta' fatturi akbar minn 10 għandu jkun evitat, u għandu jkun iġġustifikata jekk ikun applikat.

25. Kif diskuss ulterjorment fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7), punti li għandhom jitqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:
 - Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;

 - Tossikokinetika u firxa ta' doži fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn doži esterni u interni jsehhu jew ma jsehhux;

 - Leżjonijiet prekursori, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

 - Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta' modalità ta' azzjoni, bħal doži li fihom tibda tfaqqgħi l-ċitotossicità, livelli ta' ormoni jithawdu, mekkaniżmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;

▼M4

- Reġjuni tal-kurva ta' doża-rispons fejn tkun meħtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;
 - Konsiderazzjoni ta' livelli antiċipati ta' espożizzjoni umana.
26. Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta' kontroll ta' vejjikoli jekk jintuża vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Hlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom ikunu manigġati b'mod identiku bħal daww fil-gruppi tat-test. Jekk jintuża vejjikolu, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-vejjikolu fl-oġġla volum użat fost il-gruppi ta' doża. Jekk kimika għall-ittestjar tkun amministrata fid-dieta, u tikkawża li jittiehed anqas ikel tad-dieta b'mod sinifikanti minhabba dieta b'anqas palat, grupp ta' kontroll addizzjonali ta' tmigh lil pari jista' jkun utli biex iservi ta' kontroll aktar adattat.

Preparazzjoni ta' doži 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-ghan tal-istudju, il-proprietajiet fizikokimiċi 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 jintgħazel biss għal daww 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 inkluzi 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 tinhall jew tiġi sospiza f'vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u addittivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprietajiet 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-qamha) 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-koncentrazzjoni 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 koncentrazzjoni kostanti ta' dieta (mg/kg dieta jew ppm) jew livell wiehed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼M4

30. Fil-każ ta' amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-gimgha), normalment għal perjodu ta' 24 xahar għal roditori (ara wkoll il-paragrafu 32). Kull reġim iehor ta' dożaġġ, eż. hamest ijiem fil-gimgha, jehtieglu jkun iġġustifikat. Fil-każ ta' amministrazzjoni dermali, annimali jkunu normalment ittrattati bil-kimika għall-ittestjar għal mill-anqas 6 sigħat kuljum, 7 ijiem fil-gimgha, 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-gimgha, iżda tista' tintuża wkoll espożizzjoni għal 5 ijiem fil-gimgha, jekk dan ikun ġustifikat. Il-perjodu ta' espożizzjoni jkun normalment għal perjodu ta' 24 xahar. Jekk speċijiet ta' roditori minbarra l-firien ikunu esposti mill-imnieher 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 rqiġ ta' intubazzjoni adattat, f'hinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża waħda darba kuljum; fejn pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista' jkun possibbli li tinzamm ir-rata ta' doża kuljum billi din tkun amministrata b'hala doża maqsuma (darbtejn kuljum). Il-volum massimu ta' likwidu li jkun jista' jiġi amministrat f'waqt wiehed 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 roditori (31). Il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun imminimizzata billi l-konċentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun zgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jehtieġilhom 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 roditori, li jirrappreżenta l-maġġoranza tal-hajja kollha normali tal-annimali li għandhom jintużaw. Jistgħu jintużaw studji aqsar jew itwal, skont it-tul tal-hajja tar-razza tal-ispeċijiet ta' annimali fl-istudju, iżda għandhom ikunu ġġustifikati. Għal razze speċifiċi ta' ġrieden, eż. AKR/J, C3H/J jew C57BL/6J durata ta' 18-il xahar tista' tkun aktar adattata. Dan li ġej jipprovdri xi gwida dwar durata, tmiem tal-istudju u sopravivenza; gwida ulterjuri, inkluża konsiderazzjoni ta' aċċettabbiltà ta' karċinoġenicità 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 Tossicità Kronika u Karċinoġenicità (7).

— It-tmiem tal-istudju għandu jitqies meta l-ghadd ta' superstiti fil-gruppi ta' doża aktar baxxa jew fil-grupp ta' kontroll jinżel taht il-25 fil-mija.

— Fil-każ fejn il-grupp ta' doża għolja biss imut hesrem minhabba tossicità, dan m'għandux jikkawża t-tmiem tal-istudju.

— Is-sopravivenza ta' kull sess għandha titqies separatament.

— L-istudju m'għandux ikun estiż lil hinn mill-punt meta d-dejta disponibbli mill-istudju ma tkunx aktar suffiċjenti biex tkun tista' ssir evalwazzjoni valida statistikament.

▼ M4

OSSERVAZZJONIJIET

33. L-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati għall-morbidità jew għall-mortalità, is-soltu fil-bidu u fit-tmiem ta' kull jum, inklużi fi tmiem il-ġimgħa u l-btajjel. L-annimali għandhom addizzjonalment ikunu eżaminati darba kuljum għal sinjali speċifiċi ta' rilevanza tossikoloġika, filwaqt li jitqies il-perjodu massimu ta' effetti antiċipati wara dożaġġ fil-każ ta' amministrazzjoni b'gavage. Għandha tingħata attenzjoni partikulari lil żvilupp ta' tumuri; u għandu jiġi rreġistrat iż-żmien meta jfaqqgħu tumuri, post, dimensjonijiet, dehra u progressjoni ta' kull tumor 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-kejljiet 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 kejljiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

Ematoloġija, bijokimika klinika u kejljiet oħra

35. Biex jintlaħaq il-massimu tal-informazzjoni miksuba mill-istudju, speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni, ikunu jistgħu jittiehdu kampjuni tad-demem għalematoloġija u bijokimika klinika, u dan fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Analizi tal-awrina jista' wkoll ikun adattat. Gwida ulterjuri dwar il-valur ta' tehid ta' kampjuni bħal dawn bħala parti minn studju tal-karċinogeniċità hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Jekk jitqies li jkun adattat, tehid ta' kampjuni tad-demem għal determinazzjonijiet ematoloġiċi u ta' kimika klinika u għal analizi 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 jittiehdu kampjuni tad-demem 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-ghadam ikun l-organu mmirat, għalkemm il-valur ta' eżami bħal dan għall-valutazzjoni ta' potenzjal karċinogeniku/onkoġeniku huwa dubjuż (32).

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

36. L-annimali kollha fl-istudju hliet annimali sentinelli (ara l-paragrafu 20) u annimali satellitarji oħra għandhom ikunu ssoġġettati għall-awtopsja makroskopika shiha u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wieċ estern tal-ġisem, tal-fethiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. L-annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra jista' jkun jehtigilhom awtopsja abbazi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Piżijiet ta' organi ma jkunux normalment parti minn studju karċinogenesi, minhabba li bidliet gerjatriċi u, fi stadji ta' wara, l-iżvilupp ta' tumuri thawwad l-utilità ta' dejta dwar piżijiet ta' organi. Huma jistgħu, iżda, ikunu importanti biex jittiehed piż ta' valutazzjoni ta' evidenza u speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni. Jekk ma jkunux parti minn studju satellitarju, huma għandhom jingabru mhux aktar tard minn sena wara l-bidu tal-istudju.

▼ M4

37. It-tessuti li ġejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku mahsub 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
mohħ (inkluzi taqsimiet taċ-cerebru, ċervellett, u medulla/mezoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugh (straorbitali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bżieq	trakea
il-musrana l-hoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluz ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inkluzi mniefer, turbinati u sinus paranażali]	gilda	[ureteru]
għajn (inkluz r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtora-ċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vagġina
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 jissuggerixxu l-htiega li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbazi tal-proprietajiet 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-tehid ta' kampjuni speċifiċi u l-preservazzjoni tal-gilda 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 u B.29 ta' dan l-Anness. Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

▼ M4*Istopatoloġija*

38. Hija disponibbli gwiċċa 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, daww 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 RAPPORTAR**Dejta**

39. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. 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 għal raġunijiet umani u l-hin 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-hames 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 jintgħazlu matul it-tfassil tal-istudju (il-paragrafu 9). L-għażla għandha ttipprovi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun mehtieg.

Rapport tat-test

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

Kimika għall-Ittestjar:

- natura fiżika, purezza u proprjetajiet fiżikokimiċi;
- dejta ta' identifikazzjoni;

▼ M4

- sors tal-kimika;
- numru tal-lott;
- ċertifikat tal-analiżi tal-kimika;

Vejjikolu (fejn xieraq):

- ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma);

Annimali tat-test:

- speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;
- għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;
- sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;
- piżijiet individwali ta' kull annimal fil-bidu tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test:

- motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;
- meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;
- dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta.
- dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omogeneità tal-preparazzjoni;
- rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
- għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieher jew il-ġisem kollu;
- dozi 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, kalkolazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma, jekk applikabbli;
- dejta tossikokinetika (jekk disponibbli);
- oftalmoskopija (jekk disponibbli);
- ematoloġija (jekk disponibbli);
- kimika klinika (jekk disponibbli);

▼ M4*Sejbiet kliniċi*

- Sinjali ta' tossiċità;
- Incidenza (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-gisem;
- Piżijiet ta' organi u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli;
- Sejbiet minn awtopsji; incidenza u severità ta' anormalitajiet;

Istopatoloġija

- Sejbiet istopatoloġiċi mhux neoplastiċi;
- Sejbiet istopatoloġiċi neoplastiċi;
- Korrelazzjoni bejn sejbiet makroskopiċi u mikroskopiċi;
- Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha relatati ma' trattament inklużi gradazzjonijiet ta' severità;
- Rapport ta' kull evalwazzjoni bejn il-pari dwar is-slides;

*Trattament ta' statistika ta' riżultati, kif jixraq**Diskussjoni dwar ir-riżultati inklużi*

- Diskussjoni dwar kull approċċ ta' mudellar;
- Relazzjonijiet ta' doża-rispons;
- Dejta storika ta' kontroll;
- Qies ta' kull informazzjoni dwar modalità ta' azzjoni;
- Determinazzjoni ta' BMD, NOAEL jew LOAEL
- Rilevanza għall-bnedmin;

*Konklużjonijiet***LETTERATURA:**

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼ **M4**

- (6) Il-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossicità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossicità 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: Tossicità tal-Inalazzjoni Subakuta Studju ta' 28 Jum.
- (10) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossicità tal-Inalazzjoni Subkronika Studju ta' 90 Jum.
- (11) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossicità (Dermali) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼ **M4**

- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.
- (27) Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.
- (32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.
- (33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼ **M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

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

▼ M4

B.33. **STUDJI KONGUNTI DWAR TOSSICITÀ
KRONIKA/KARĊINOĠENIČITÀ**

DAHLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti ghal-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 mehtieg 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' revizjonijiet tal-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness: Studji dwar il-Karċinoġeniċità, u tal-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness, studji dwar Tossicità Kronika, bil-ghan li jinkiseb taghrif addizzjonali mill-annimali użati fl-istudju u li jinghataw aktar dettalji dwar ghażla ta' doża. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa mfassal biex jintuża fl-ittestjar ta' firxa wiesgħa ta' kimiċi, inkluzi pesticidi 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 tossicità kronika u karċinoġeniċità jsiru fi speċijiet ta' rodituri u dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa, għalhekk, mahsub biex japplika primarjament għal studji magħmulin f'dawn l-ispeċijiet. Jekk studji bħal dawn ikunu mehtieġa fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, il-prinċipji u l-proċeduri li tagħhom jinghata profil jistgħu wkoll ikunu applikati, b'modifiki xierqa, flimkien ma' daww li l-profil tagħhom jinsab fil-Kapitolu B.27 ta' dan l-Anness: Studju dwar Tossicità 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 Tossicità Kronika u Karċinoġeniċità (7).

3. It-tliet rotot ewlenin ta' amministrazzjoni użati fi studji dwar tossicità kronika/karċinoġeniċità huma orali, dermali u ta' inalazzjoni. L-ghażla tar-rotta ta' amministrazzjoni tiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi u kimiċi tal-kimika għall-ittestjar u mir-rotta predominanti ta' espożizzjoni umana. Informazzjoni addizzjonali dwar ghażla 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 tossicità kronika u karċinoġeniċità. Filwaqt li studji fit-tul li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta dermali u ta' inalazzjoni jistgħu wkoll ikunu mehtieġa għall-valutazzjonijiet tar-riskju għas-saħha tal-bniedem u/jew jistgħu jkunu rikjesti f'ċerti reġimi regolatorji, iż-żewġ rotot ta' espożizzjoni jinvolvu kumplessità teknika konsiderevoli. Studji bħal dawn ikun jehtigilhom jifasslu abbazi ta' każ każ, għalkemm il-Metodu ta' Ttestjar li l-profil tiegħu jidher hawn għall-valutazzjoni u l-evalwazzjoni ta' tossicità 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-rotta tal-inalazzjoni (7) (8) u dermali (7). Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (9) u l-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (10), flimkien mad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar ittestjar ta' inalazzjoni akuta (8), għandhom ikunu kkonsultati b'mod speċifiku fit-tfassil ta' studji għal tul itwal ta' żmien li jinvolvu espożizzjoni permezz tar-rotta tal-inalazzjoni. Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness (11) għandu jkun ikkonsultat fil-każ ta' ttestjar magħmul bir-rotta dermali.

▼M4

5. L-istudju kongunt tat-tossiċità kronika/karċinoġenicità jipprovdi informazzjoni dwar il-perikli għas-saħħa li jista' jkun hemm li x'aktarx jinqalghu minn espożizzjoni ripetuta għal perjodu li jdum tul il-hajja kollha tal-ispeċi użata. L-istudju għandu jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tossiċi tal-kimika għall-ittestjar, inkluża karċinoġenicità potenzjali, jindika organi mmirati u l-possibbiltà ta' akkumulazzjoni. Jista' jipprovdi stima tal-livell bla effett hażin 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 enfazi wkoll dwar il-htieġa ta' osservazzjonijiet kliniċi sewwa tal-annimali, biex tinkiseb kemm jista' jkun informazzjoni.
6. L-għanijiet ta' studji dwar tossiċità kronika/karċinoġenicità koperti minn dan il-Metodu ta' Testjar jinkludu:
 - L-identifikazzjoni tal-proprietajiet 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 karċinoġenicità,
 - Karatterizzazzjoni tar-relazzjoni doża-rispons,
 - Identifikazzjoni ta' livell bla effett hażin 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-karċinoġenicità 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-proprietajiet 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, minhabba 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-proprietajiet 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, mutaġenicità/ġenotossiċità, karċinoġenicità u dejta tossikoloġika oħra dwar kimiċi relatati strutturalment; dejta tossikokinetika disponibbli (doża wahda u wkoll kinetika ta' doża ripetuta meta tkun disponibbli) u dejta derivata

▼M4

minn studji oħra ripetuti ta' espożizzjonijiet. Id-determinazzjoni ta' tossiċità kronika/karċinoġenicità 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-karċinoġenicità għandu jittqies 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-analizi ta' riżultati, meqjusin it-tifsila u l-għanijiet sperimentali, għandhom ikunu stabbiliti qabel ma jingħata bidu għall-istudju. Kwistjonijiet li għandhom jittqiesu jinkludu jekk l-istatistika għandhiex tinkludi aġġustament għal sopravivenza, analizi ta' riskji kumulattivi ta' kanċer relattiv għal kemm iddum is-sopravivenza, analizi taż-żmien għal tumur u analizi fil-każ ta' tmien hesrem ta' grupp wiehed jew aktar. Għida dwar l-analizi xierqa ta' statistika u referenzi ewlenin għal metodi ta' statistika aċċettati internazzjonalment jingħataw fid-Dokument ta' Għida Nru 116 (7), u wkoll fid-Dokument ta' Għida Nru 35 dwar l-analizi u l-evalwazzjoni ta' studji dwar tossiċità kronika u karċinoġenicità (20).
10. Fit-tmexxja ta' studju tal-karċinoġenicità, il-prinċipji u l-konsiderazzjonijiet ta' għida li l-profil tagħhom jinsab fid-Dokument ta' Għida tal-OECD dwar l-għarfien, il-valutazzjoni u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ta' tmien 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-paragrafu jiddikjara li *"Fi studji li jinvolvu dożaġġ ripetut, meta annimal juri sinjali kliniċi li huma progressivi, u jwasslu għal iktar deterjorament fil-kundizzjoni, għandha tittiehed 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 generali tiegħu. Jekk tittiehed 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 ha jtaffi l-uġiġh jew l-iskumdità, jew li tonqos id-doża tat-test."*
11. Għida dettaljata u diskussjoni dwar il-prinċipji ta' għażla ta' doża għal studji dwar tossiċità kronika u karċinoġenicità tinsab fid-Dokument ta' Għida Nru 116 (7), kif ukoll f'żewġ pubblikazzjonijiet tal-Internazzjonali Life Sciences Institute (22) (23). L-istrategġija 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 doži baxxi u r-rilevanza tagħhom minn naħa oħra. Dan huwa partikolarment rilevanti fil-każ ta' dan l-istudju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġenicità.
12. Għandha tingħata konsiderazzjoni li jsir dan l-istudju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġenicità, milli eżekuzzjoni separata ta' studju dwar tossiċità kronika (il-Kapitolu B.30 ta' dan l-Anness) u studju tal-karċinoġenicità (il-Kapitolu B.32 ta' dan l-Anness). It-test kongunt jipprovdi aktar effiċjenza fir-rigward ta' hin 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' karċinoġenicità. Izda għandhom jittqiesu sewwa l-prinċipji ta' għażla ta' doża (paragrafi 11 u 22-26) meta jsir studju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġenicità, u huwa rikonoxxut ukoll li jistgħu jkunu meħtieġa studji separati f'ċerti oqfsa regolatorji. Għida ulterjuri dwar it-tifsila tal-istudju kongunt ta' tossiċità kronika u karċinoġenicità 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' Għida Nru 116 (7).

▼M4

13. Definizzjonijiet użati fil-kuntest ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jinsabu fl-aħħar ta' dan il-kapitolu u fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. Id-disinn tal-istudju jikkonsisti f'żewġ fażijiet parallelli, fażi kronika u fażi ta' karċinoġeniċità (għad-durata ara l-paragrafi 34 u 35 rispettivament). Il-kimika għall-ittestjar normalment tkun amministrata bir-rotta orali għalkemm l-ittestjar bir-rotta tal-inalazzjoni jew dermali jista' wkoll ikun adattat. Għal fażi kronika, il-kimika għall-ittestjar tkun amministrata kuljum f'dożi gradwati lil diversi gruppi ta' annimali tat-test, b'livell ta' doża wahda għal kull grupp, normalment għal perjodu ta' 12-il xahar, għalkemm jistgħu jintgħazlu wkoll perjodi itwal jew aqsar skont rekwiżiti regolatorji (ara l-paragrafu 34). Dan il-perjodu jintgħazel li jkun twil biżżejjed biex kull effett ta' tossiċità kumulattiva jsir jidher, mingħajr l-effetti ta' tahwid ta' bidliet ġerjatriċi. It-tifsila tal-istudju tista' tinkludi wkoll qatla interim wahda jew aktar, eż. fit-tielet jew fis-sitt xahar, u jistgħu jkunu inkluzi 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' hajjithom 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 issirrilhom awtopsja u, fit-tmiem tat-test, annimali li jkunu baqgħu hajjin jinqatlu u ssirrilhom 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 tissuggerixxi li jkunu aktar rilevanti għat-tbassir ta' effetti ta' sahha 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 mehtieg sakemm ma jkunx deċiż li studju bħal dan ma jkunx mehtieg xjentifikament. Firien u ġrieden kienu l-mudelli ppreferuti għall-esperimenti minhabba l-hajja 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-tweqqif ta' studji dwar tossiċità kronika/karċinoġeniċità fi speċijiet ta' annimali mhux rodituri, meta jkunu mehtieġa, għandhom ikunu bbazati fuq il-prinċipji li l-profil tagħhom jinsab f'dan il-Metodu ta' Ttestjar flimkien ma' daww 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 żgħażaġh f'saħħithom ta' razez li komunement jintużaw fil-laboratorju. L-istudju kongunt tat-tossiċità kronika/karċinoġeniċità għandu jsir f'annimali mill-istess razza u sors bħal daww użati fi studju/i preliminari dwar tossiċità li jdum(u) anqas, għalkemm, jekk annimali minn din ir-razza u sors ikunu magħrufa li jipprezentaw 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. Innisa m'għandhomx ikunu welldu u m'għandhomx ikunu tqal.

▼ M4

Kundizzjonijiet ta' abitazzjoni u għalf

17. L-annimali jistgħu jitqiedu jabitaw individwalment, jew jitqiegħdu f'gagēg fi gruppi żgħar tal-istess sess; abitazzjoni għal kull annimal wahdu għandha titqies biss jekk dan ikun ġustifikat xjentifikament (27) (28) (29). Il-gagēg għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti li jista' jkun hemm minhabba t-tqegħid ta' gagēg. It-temperatura fil-kamra tal-esperimenti tal-annimali għandha tkun 22 °C ($\pm$ 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-dietta għandha tissodisfa l-htigijiet nutrizzjonali kollha tal-ispeċi ttestjata u l-kontenut ta' kontaminanti tad-dietta, inklużi iżda mhux limitament għal residwi ta' pestiċidi, sustanzi organiċi niġġiesa persistenti, fitoestrogeni, 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-nutrient u tad-dietta għandha tkun iġġenerata perġodikament, 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-htieġa li tkun żgurata tahlita adattata ta' kimika għall-ittestjar u biex ikunu sodisfatti l-htigijiet nutrizzjonali tal-annimali meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata permezz tar-rotta tad-dietta.

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 ġimġat. 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 $\pm$ 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' karċinoġenicità tal-istudju għandhom, għalhekk, ikun fihom mill-anqas 50 annimal taż-żewġ sessi. Skont x'ikun l-għan tal-istudju, jista' jkun possibbli li tiddied il-qawwa ta' statistika tal-istimi ewlenin billi annimali jkunu allokat i 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'dozi baxxi. Iżda għandu jkun irrikonoxxut li zieda moderata fid-daqs ta' grupp għandha tipprovdi relattivament ftit zieda 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' tossicità kronika

▼M4

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-istudju 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 kongunt ikun, iżda, sostnut mid-dejta mill-għadd akbar ta' annimali fil-fażi ta' karċinoġenicità tal-istudju. Fi studji li jinvolvu grieden, jistgħu jkunu mehtieġa annimali addizzjonali f'kull grupp ta' doża tal-fażi ta' tossiċità kronika, biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi mehtieġa kollha. Aktar informazzjoni dwar tfassil ta' statistika tal-istudju u għażla ta' livelli ta' doża biex jintlahaq 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' karċinoġenicità 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 mehtieġ, 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 għaž-żewġ sessi, u l-għadd totali ta' annimali inklużi fit-tifsila tal-istudju għandu jizdied bl-għadd skedat ta' annimali 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, kejljiet ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika u investigazzjonijiet patoloġiċi bħall-annimali fil-fażi ta' tossiċità kronika tal-istudju ewlieni, għalkemm jista' wkoll ikun hemm provvedimenti (fil-gruppi ta' qtil interim) biex kejljiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossiċità jew immunotossiċità.

Gruppi ta' doži 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' karċinoġenicità. Il-livelli ta' doża ġeneralment ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studji aqsar dwar doża ripetuta jew fuq tiftix ta' firxa u għandhom iqiesu kull dejta tossikoloġika u tossikokinetika eżistenti disponibbli għall-kimika għall-ittestjar jew għal kimiċi relatati.

▼ M4

23. Għall-fazi ta' tossiċità kronika tal-istudju, studju shiħ bl-użu ta' tliet livelli ta' doża jista' ma jittqisx li jkun mehtieġ, jekk ikun jista' jiġi anticipat 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 hlief meta espożizzjoni umana tindika l-htieġa li jkollu jintuża livell oghla ta' doża.
24. Sakemm ma jkunx limitat min-natura jew mill-effetti bijoloġiċi tal-kimika għall-ittestjar, għandu jintgħażel l-oghla 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-oghla livell ta' doża biex jislet evidenza ta' tossiċità, kif ikun jidher, pereżempju, minn tnaqqis fiż-zieda fil-piż tal-ġisem (madwar 10 %). Izda, skont x'ikunu l-għanijiet tal-istudju (ara l-paragrafu 6), tista' *tintgħażel l-oghla doża anqas mid-doża* li ttipprovi evidenza ta' tossiċità, eż. jekk doża tislet effett ħazin ta' thassib, 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 iehor tal-istudju, eż. BMD (ara l-paragrafu 27). Fatturi li għandhom jittqiesu fl-ghoti ta' dozi aktar baxxi jinkludu l-angolu mistenni tal-kurva ta' doża-rispons, id-dozi li fihom jistgħu jsehhu 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 kongunt dwar karċinogeniċità/tossiċità kronika, l-għan primarju għandu jkun li tinkiseb informazzjoni għal finijiet ta' valutazzjoni tar-riskju minn karċinogeniċità, u informazzjoni dwar tossiċità kronika tkun normalment għan sussidjarju. Wiehed għandu jiftakar dan meta tkun qed issir l-għażla ta' livelli ta' doża u spazjar ta' livelli ta' doża għall-istudju.
26. L-ispażjar 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' dozi, u ż-zieda 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 jittqiesu fl-għażla ta' doża jinkludu:
- Nonlinearitajiet magħrufin jew suspettati jew punti ta' infezzjoni fid-doża-rispons;
 - Tossikokinetika u firxa ta' dozi fejn induzzjoni metabolika, saturazzjoni jew nonlinearità bejn dozi esterni u interni jsehhu jew ma jsehhux;
 - Leżjonijiet prekursori, markaturi ta' effett jew indikaturi tal-operazzjoni ta' proċessi bijoloġiċi ewlenin sottostanti;

▼ M4

- Aspetti ewlenin (jew suspettati) ta' modalità ta' azzjoni, bħal dozi li fihom tibda tfaqqgħa' ċ-ċitotossicità, livelli ta' ormoni jithawdu, mekkanizmi omeostatiċi jintgħelbu, eċċ;
 - Reġjuni tal-kurva ta' doża-rispons fejn tkun mehtieġa stima partikolarment robusta, eż. fil-firxa tal-BMD antiċipata jew limitu suspettat;
 - Konsiderazzjonita' livelli antiċipati ta' espożizzjoni umana, speċjalment fl-għażla ta' dozi medji u baxxi.
28. Il-grupp ta' kontroll għandu jkun grupp mhux ittrattat jew grupp ta' kontroll ta' vejjikoli jekk jintuza vejjikolu biex tkun amministrata kimika għall-ittestjar. Hlief għal trattament bil-kimika għall-ittestjar, annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom ikunu manigġati b'mod identiku bħal dawk fil-gruppi tat-test. Jekk jintuza 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 jittiehed anqas ikel tad-dieta b'mod sinifikanti minhabba dieta b'anqas palat, grupp ta' kontroll addizzjonali ta' tmigh lil pari jista' jkun utli biex iservi ta' kontroll aktar adattat.

Preparazzjoni ta' dozi 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-proprietajiet 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. Izda, għal xi xenarji, eż. espożizzjoni okkupazzjonali, amministrazzjoni permezz ta' rotot oħra tista' tkun aktar adattata.
30. Meta jkun mehtieġ, il-kimika għall-ittestjar tinhall jew tiġi sospiza f'vejjikolu adattat. Għandhom jitqiesu l-karatteristiċi li ġejjin tal-vejjikolu u addittivi oħra, kif jixraq: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, jew ir-ritenzjoni tal-kimika għall-ittestjar; effetti fuq il-proprietajiet 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' dożagġ 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 jfjixklux in-nutrizzjoni normali jew il-bilanċ tal-ilma. Fi studji fit-tul dwar tossiċità bl-użu ta' amministrazzjoni ta' dieta, il-koncentrazzjoni 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 koncentrazzjoni kostanti ta' dieta (mg/kg dieta jew ppm), jew livell wiehed kostanti ta' doża skont il-piż tal-ġisem tal-annimal (mg/kg tal-piż tal-ġisem), ikkalkulat kull ġimgħa. L-alternattiva użata għandha tkun speċifikata.

▼ M4

32. Fil-każ ta' amministrazzjoni orali, l-annimali jingħataw doża bil-kimika għall-ittestjar kuljum (sebat ijiem fil-ġimgħa) għal perjodu ta' 12-il xahar (fażi kronika) jew 24 xahar (fażi ta' karċinoġeniċità), ara wkoll il-paragrafi 33 u 34. Kwalunkwe reġim ieħor ta' dożaġġ, eż. hamest ijiem fil-ġimgħa, jehtieġlu 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, izda 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-innieher biss, il-perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex tinnaqqas 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'hinijiet simili kull jum. Normalment tkun amministrata doża wahda darba kuljum, meta pereżempju kimika tkun irritant lokali, jista' jkun possibbli li tinzamm 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 wiehed 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-koncentrazzjoni tkun aġġustata biex ikun żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Kimiċi li jistgħu jkunu korrużivi jew irritanti jkunu l-eċċezzjoni, u jkun jehtieġilhom jiġu dilwiti biex ikunu evitati effetti lokali severi. Ittestjar f'koncentrazzjonijiet 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-rekwiziti 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' dawkl li jdumu anqas. Il-gruppi kollha ta' doża allokat li lil din il-fażi għandhom jintemmu fiż-żmien indikat għal evalwazzjoni ta' tossiċità kronika u għal patoloġija mhux neoplastika. Gruppi satellitarji inkluzi 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-hajja kollha normali tal-annimali li għandhom jintużaw. Jistgħu jintużaw studji aqsar jew itwal, skont it-tul tal-hajja tar-razza tal-ispeċijiet ta' annimali fl-istudju, izda għandhom ikunu ġġustifikati. Għal razzi speċifiċi ta' grieden, eż. AKR/J, C3H/J jew C57BL/6J durata ta' 18-il xahar tista' tkun aktar adattata. Dan li ġej jipprovdix xi gwida dwar durata, tmiem tal-istudju u sopravivenza; gwida ulterjuri, inkluzi konsiderazzjoni tal-aċċettabbiltà ta' studju ta' karċinoġeniċità negattiva relattiva għal sopravivenza fl-istudju, hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7):

▼M4

- It-tmiem tal-istudju għandu jitqies meta l-ghadd ta' superstiti fil-gruppi ta' doża aktar baxxa jew fil-grupp ta' kontroll jinżel taht il-25 fil-mija.
- Fil-każ fejn il-grupp ta' doża għolja biss imut hesrem minhabba 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 (FAŽI 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 hin(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 jithallew isiru paraguni skont is-sugġett), 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'hinijiet simili għal kull jum f'kull okkażjoni. Huma għandhom ikunu rreġistrati sewwa, preferibbilment billi jintużaw sistemi ta' punti, iddefiniti esplicitament 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 attivitá awtonomika (eż. tidmigh, 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 bizarra (eż. awtomutilazzjoni, mixi b'lura) għandhom ukoll ikunu rreġistrati (32).
38. Eżami oftalmologiku, bl-użu ta' oftalmoskopju jew tagħmir iehor 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 ohra jissuggerixxu tossiċità okulari, f'dak il-każ il-frekwenza ta' eżami okulari għandha tizdied.
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-smigh, viżivi u proprjoċettivi) (33) (34) (35), ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultattiv valutazzjoni tal-qawwa ta' qbid (36) u valutazzjoni tal-attività motorja (37) qabel il-bidu tal-istudju u f'perjodi ta' 3 xhur wara li jkun beda l-istudju sa u inklużi 12-il xahar, kif ukoll fit-tmiem tal-istudju (jekk ikun itwal minn 12-il xahar). Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu jkunu segwiti jingħataw fir-referenzi rispettivi. Iżda jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi minbarra dawk fir-referenzi.

▼M4

40. Għal kimiċi fejn testijiet preċedenti ta' tossiċità għal doża ripetuta għal 28 jum u/jew għal 90 jum ikunu indikaw il-potenzjal li jikkawżaw effetti immunotossiċi, investigazzjonijiet ulterjuri ta' dan il-punt ta' tmiem ikunu jistgħu jsiru b'mod fakultattiv fit-tmiem.

Piż tal-gisem, konsum ta' ikel/ilma u effiċjenza fl-ikel

41. L-annimali kollha għandhom jintiżnu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-gimgha għall-ewwel 13-il gimgha u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejljiet ta' konsum ta' ikel u ta' effiċjenza fl-ikel għandhom isiru mill-anqas kull gimgha għall-ewwel 13-il gimgha u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel mill-anqas kull gimgha għall-ewwel 13-il gimgha u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem meta l-kimika għall-ittestjar tkun amministrata f'ilma tax-xorb. Għandhom jitqies wkoll kejljiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

Ematoloġija u bijokimika klinika

42. Fi studji li jinvolvu roditori, 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 grieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ematoloġiċi meħtieġa kollha (ara l-paragrafu 19). Fi studji ta' annimali mhux roditori, jittiehdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'hinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal roditori. Il-kejljiet kull 3 xhur, għal roditori jew għal annimali mhux roditori, jistgħu ma jsirux jekk ma jkunu deher ebda effetti fuq parametri ematoloġiċi fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Għandhom jittiehdu kampjuni tad-demmi minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardjaku jew minn sinus retroorbitali, b'anestezija.
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 attivati. 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, speċifikament, ta' effetti fuq il-kliwi u l-fwied, għandhom isiru fuq kampjuni tad-demmi 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 grieden, jistgħu jkunu meħtieġa annimali satellitarji biex isiru d-determinazzjonijiet ta' bijokimika klinika kollha meħtieġa. Fi studji ta' annimali mhux roditori, jittiehdu kampjuni minn għadd iżgħar ta' annimali (eż. 4 annimali għal kull sess u għal kull grupp fi studji dwar il-klieb), f'hinijiet interim ta' teħid ta' kampjuni u fit-tmiem kif deskritt għal roditori. Jistgħu ma jsirux kejljiet

▼ M4

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-grieden) qabel ma jittiehdu kampjuni tad-demmi⁽¹⁾. Il-lista ta' parametri li għejja għandha tkun investigata (38): glukozju, urea (nitroġenu tal-urea), kreatinina, proteina totali, albumina, kalċju, sodju, potassju, kolesterol totali, mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatoċellulari (aminotransferazi tal-alanina, aspartate aminotransferazi, glutamat ta' deidroġenazi, aċidi totali tal-bili) (39), u mill-anqas żewġ testijiet adatti għal evalwazzjoni epatobiljari (fosfatazi alkalina, gamma glutamil trasferimentazi, 5'-nukleotidazi, bilirubina totali, aċidi totali tal-bili) (39). Parametri oħra ta' bijokimika klinika bħal trigliċeridi sajmin, ormoni speċifiċi u kolinesterazi jistgħu jitkejlu kif jixraq, skont it-tossicità tal-kimika għall-ittestjar. B'mod ġenerali, hemm htieġa ta' approċċ flessibbli, skont l-effett osservat u/jew mistenni minn kimika partikolari għall-ittestjar.

45. Determinazzjonijiet ta' analizi 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 mehtieġ isiru kejljiet kull 3 xhur jekk ma jkun deher ebda effett fuq analizi tal-awrina fi studju preċedenti ta' 90 jum magħmul f'livelli komparabbli ta' doża. Il-lista ta' parametri li għejja kienet inkluża f'rrakkomandazzjoni esperta dwar studji ta' patoloġija klinika (38): dehra, volum, ożmolalità jew gravità speċifika, pH, proteina totali u glukozju. Determinazzjonijiet oħra jinkludu keton, urobilinogenu, bilirubina u demm mohbi. Jistgħu jintużaw aktar parametri meta jkun mehtieġ biex tkun estiża l-investigazzjoni ta' effett(i) osservat(i).
46. Huwa meqjus b'mod ġenerali li jehtieġu jkunu ddeterminati varjabbli bazi ematoloġiċi u ta' bijokimika klinika qabel trattament għal studji dwar il-klieb, iżda ma jehtieġilhomx ikunu ddeterminati fi studji dwar rodituri (38). Iżda, jekk dejta bazi 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 shiha u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wiċċ estern tal-ġisem, tal-fethiet 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 kejljiet ikunu ristretti għal miżuri speċifiċi ewlenin bħal newrotossicità jew immunotossicità (ara l-paragrafu 21). Dawn l-annimali jistgħu ma jkunux soġġetti għal awtopsja u għall-proċeduri sussegwenti deskritti fil-paragrafi li għejjin. L-annimali sentinelli jista' jkun jehtieġilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju.

⁽¹⁾ Għal għadd ta' kejljiet ta' serum u plazma, notevolment l-aktar għall-glukozju, sawm matul il-lejl huwa ppreferut. Ir-raġuni ewlenija għal din il-preferenza hija li aktar varjabbiltà li għandha inevitabilment tirriżulta minn nuqqas ta' sawm, tittendi li tahbi effetti aktar sottili u tagħmel l-interpretazzjoni diffiċli. Iżda għandu jkun innotat li sawn tul il-lejl jista' johloq interferenza fil-metabolizmu ġenerali tal-annimali u, b'mod partikolari fi studji dwar għoti ta' ikel, jista' jiddisturba l-espożizzjoni ta' kull jum għall-kimika għall-ittestjar. L-annimali kollha għandhom ikunu vvalutati fl-istess kondizzjoni fiżjoloġika, u valutazzjonijiet dettaljati jew newroloġiċi għandhom preferibbilment ikunu, għalhekk, skedati għal jum differenti milli għal teħid ta' kampjuni ta' bijokimika klinika.

▼ M4

48. Pizijiet ta' organi għandhom jingabru mill-annimali kollha, minbarra daww esklużi bil-parti tal-aħħar tal-paragrafu 47. L-adrenali, il-mohħ, l-epididimi, il-qalb, il-kliewi, il-fwied, l-ovarji, il-milsa, it-testikoli, it-tirojde (jintiznu wara fissazzjoni, ma' paratirojdi), u l-utru tal-annimali kollha (minbarra ta' daww misjubin qed imutu u/jew qed jinqatlu fil-frattemp) għandhom jintraqmu minn kull tessut imwahaħħal magħhom, kif jixraq, u l-piż tagħhom fl-imxarrab għandu jittiehed malajr kemm jista' jkun wara dissezzjoni biex ma jithallix ikun hemm inxif.
49. It-tessuti li għejjin għandhom ikunu ppreservati fil-midjum ta' fissazzjoni l-aktar adattat kemm għat-tip ta' tessut, kif ukoll għall-eżami istopatoloġiku mahsub sussegwentement (40) (tessuti f'parentezi 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
mohħ (inkluzi taqsimiet ta' ċerebru, ċervellett, u medulla/mezoċefalu)	kliewi	pitwitarja	timu
il-musrana l-għamja	glandola tad-dmugh (straoritali)	prostata	tirojde
ċerviċi	fwied	il-musrana d-dritta	[lsien]
glandola tal-koagulazzjoni	pulmun	glandola tal-bzieq	trakea
il-musrana l-hoxna	nodi limfatiċi (kemm superfiċjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina
duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluz ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inkluzi mnier, turbinati u sinus paranażali]	gilda	[ureteru]
għajn (inkluz r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtora-ċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-għaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vagina
bużżieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-ghadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-ghadam
Glandola ta' Harder			

▼ M4

Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati. Is-sejbiet kliniċi u oħrajn jistgħu jissuġġerixxu l-htieġa 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 jinvolve r-rotta dermal ta' amministrazzjoni, il-lista ta'organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata, u jkunu meħtieġa teħid ta' kampjuni speċifiċi u preservazzjoni tal-gilda 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 speċifikament 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 tumor li jkun jidher sewwa u jista' jintness.
52. L-annimali kollha għandhom jintiznu meta jibda t-trattament, mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull xahar minn hemm 'il quddiem. Il-kejljiet 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 kejljiet tal-konsum tal-ilma għal studji li fihom l-attività tax-xorb tinbidel.

▼ M4

Ematoloġija, bijokimika klinika u kejljiet oħra

53. Biex jintlahaq il-massimu tal-informazzjoni miksuba mill-istudju, speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni, ikunu jistgħu jittiehdu kampjuni tad-demem 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' tehid ta' kampjuni bħal dawn bħala parti minn studju tal-karċinogeniċità hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida Nru 116 (7). Jekk jittiehdu kampjuni tad-demem, dawn għandhom jingabru fit-tmiem tal-perjodu tat-test, eżatt qabel jew bħala parti mill-proċedura għall-qtil tal-annimali. Huma għandhom jittiehed minn sit imsemmi, pereżempju b'titqib kardjaku jew mis-sinus retroorbitali, b'anestezija. 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-demem fil-fażi ta' karċinogeniċità għall-valutazzjoni ta' potenzjal karċinogeniku/onkoġeniku huwa dubjuż (38).

PATOLOĠIJA

Awtopsja makroskopika

54. L-annimali kollha fl-istudju hliet annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra (ara l-paragrafu 20) għandhom ikunu ssoġġettati għal awtopsja makroskopika shiha u dettaljata li tkun tinkludi eżami bir-reqqa tal-wieċ estern tal-gisem, tal-fethiet kollha u tal-kavitajiet kranjali, toraċiċi u abdominali u tal-kontenuti tagħhom. L-annimali sentinelli u annimali satellitarji oħra jista' jkun jehtigilhom awtopsja abbażi ta' każ każ, fid-diskrezzjoni tad-direttur tal-istudju. Pizijiet ta' organi ma jkunux normalment parti minn studju karċinogenesi, minhabba li bidliet ġerjatriċi u, fi stadji ta' wara, l-iżvilupp ta' tumuri thawwad l-utilità ta' dejta dwar pizijiet ta' organi. Huma jistgħu, iżda, ikunu importanti biex jittiehed piż ta' valutazzjoni ta' evidenza u speċjalment għal konsiderazzjonijiet ta' modalità ta' azzjoni. Jekk ma jkunux parti minn studju satellitarju, huma għandhom jingabru 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 mahsub sussegwentement (40) (tessuti f'parentezi 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
mohħ (inkluzi taqsimiet taċ-ċerebru, ċervellet, u medulla/mezoċefalu)	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-hoxna	nodi limfatiċi (kemm superficjali kif ukoll fondi)	bużżieqa seminali	bużżieqa tal-awrina

▼ M4

duwodenu	glandola mammarja (bilfors għan-nisa u, jekk dissettabbli b'mod viżibbli, għall-irġiel)	muskolu skeletali	utru (inkluż ċerviċi)
epididymis	[sistema respiratorja ta' fuq, inklużi mniefer, turbinati u sinus paranażali]	gilda	[ureteru]
ghajn (inkluża r-retina)	esofagu	nerv vertebrali (fi tlett livelli: ċervikali, midtora-ċiku u lumbari)	[uretra]
[wirk bl-ghaksa]	[basla tax-xamm]	milsa	vagina
buzzieqa tal-marrara (għal speċijiet minbarra l-far)	ovarju	[sternu],	taqsima tal-mudullun tal-ghadam u/jew aspirat frisk tal-mudullun tal-ghadam
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-htieġa li jkunu eżaminati tessuti addizzjonali. Għandu wkoll ikun ippreservat kull organu li x'aktarx ikun meqjus bħala organu mmirat abbażi tal-proprietajiet 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-gilda mis-sit ta' applikazzjoni. Fi studji ta' inalazzjoni, il-lista ta' tessuti ppreservati u eżaminati mis-sistema respiratorja għandha ssegwi r-rakkomandazzjonijiet tal-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness (8) u tal-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness (9). Għal organi/tessuti oħra (u b'żieda mat-tessuti ppreservati speċifikatament mis-sistema respiratorja) il-lista ta' organi kif stabbilita għar-rotta orali għandha tkun eżaminata.

Istopatoloġija

56. Hija disponibbli gwida dwar l-aħjar Prattiki fit-tmexxija ta' studji dwar patoloġija tossikoloġika (40). Il-minimu ta' tessuti eżaminati għandu jkun:

- It-tessuti kollha mill-gruppi ta' doża għolja u ta' kontroll;
- It-tessuti kollha ta' annimali qed imutu jew li jkunu nqatlu matul l-istudju;
- It-tessuti kollha li juru anormalitajiet makroskopiċi inklużi tumuri;
- Meta bidliet istopatoloġiċi relatati ma' trattament ikunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, dawk l-istess tessuti għandhom ikunu eżaminati mill-annimali kollha fil-gruppi l-oħra kollha ta' doża;
- Fil-każ ta' organi akkoppjati, eż. kliewi, adrenali, iż-żewġ organi għandhom ikunu ppreservati.

▼ **M4****DEJTA U RAPPORTAR (KARĊINOĠENIĊITÀ U TOSSIĊITÀ KRONIKA)****Dejta**

57. Għandha tkun ipprovduta dejta dwar annimali individwalment għall-parametri kollha evalwati. 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 għal raġunijiet umani u l-hin 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 jibdwew 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-hames 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 ttiprovdi għal aġġustamenti ta' sopravivenza, jekk ikun meħtieġ.
60. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Kimika għall-ittestjar:

- natura fizika, purezza u proprjetajiet fizikokimiċi;
- dejta ta' identifikazzjoni;
- sors tal-kimika;
- numru tal-lott;
- ċertifikat tal-analiżi tal-kimika.

Vejjikolu (fejn xieraq):

- ġustifikazzjoni għal għażla ta' vejjikolu (jekk ma jkunx ilma).

Annimali tat-test:

- speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla magħmula;
- għadd, età u sess tal-annimali fil-bidu tat-test;
- sors, kundizzjonijiet ta' abitazzjoni, dieta, eċċ.;
- piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

▼ M4*Kundizzjonijiet tat-test:*

- motiv għal rotta ta' amministrazzjoni u għażla ta' doża;
- meta jkun applikabbli, il-metodi ta' statistika użati biex tkun analizzata d-dejta;
- dettalji ta' formulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar/preparazzjoni tad-dieta;
- dejta analitika dwar konċentrazzjoni miksuba, stabbiltà u omoġeneità tal-preparazzjoni;
- rotta ta' amministrazzjoni u dettalji tal-amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
- għal studji ta' inalazzjoni, jekk hux l-imnieher jew il-gisem kollu;
- dozi attwali (mg/kg tal-piż tal-gisem/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):

Generali

- Dejta dwar sopravivenza;
- Piż tal-gisem/bidliet fil-piż tal-gisem;
- Konsum ta' ikel, kalkulazzjonijiet ta' effiċjenza fl-ikel, jekk ikunu saru, u konsum tal-ilma jekk applikabbli;
- Dejta tossikokinetika jekk disponibbli;
- Oftalmoskopija (jekk disponibbli)
- Ematologija (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-gisem;
- Piżijiet ta' organi u l-proporzjonijiet tagħhom, jekk applikabbli;
- Sejbiet minn awtopsji; inċidenza u severità ta' anormalitajiet.

Istopatologija

- Sejbiet istopatoloġiċi mhux neoplastiċi,
- Sejbiet istopatoloġiċi neoplastiċi,

▼M4

- Korrelazzjoni bejn sejbiet makroskopiċi u mikroskopiċi;
- Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha relatati ma' trament 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 Tossicità Orali dwar Doża Ripetuta għal 90 Jum ta' Test ta' Subtossicità Kronika Orali f'Animali 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. Tossicità tal-Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 jum.
- (10) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: Tossicità tal-Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.
- (11) Il-Kapitolu B.9 ta' dan l-Anness, Tossicità (Dermal) ta' Doża Ripetuta (28 Jum).

▼ **M4**

- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol*, 36:793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol*. 33: 581-589.
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci*. 89: 51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol*. 33: 591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Crit. Rev. Toxicol*. 36, 1-7.
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol*. 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN u Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.

▼ **M4**

- (27) Id-Direttiva 2010/63/EU tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali li jintużaw għal skopijiet xjentifiċi (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

▼ M4

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

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

▼B**B.34. TEST TA' TOSSICITÀ FUQ IR-RIPRODUZZJONI FUQ ĠENERAZZJONI WAHDA****1. METODU****1.1 INTRODUZZJONI**

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.3 SUSTANZI GHAR-REFERENZA

Xejn.

1.4 PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza ittestjata hi somministrata f'dozi gradwati lil diversi gruppi ta' nisa u rġiel. L-irġiel għandhom ikunu iddożati waqt li jkunu qed jikbru u għallinqas għal ciklu spermatogenetiku wiehed (bejn wiehed u iehor 56 ġurnata għall-ġurdien u 70 ġurnata għall-far) sabiex jidher kwalunkwe effetti negattiv tas-sustanza ittestjata fuq l-ispermatoġenesi.

Nisa tal-ġenerazzjoni parentali (P) għandhom ikunu iddożati għall-inqas għal żewġ cikli totali ta' sahna sesswali sabiex jidher kwalunkwe effetti negattiv tas-sustanza ittestjata fuq din is-sahna sesswali. Imbagħad l-annimali jiġu mġhamra. Is-sustanza ittestjata tiġi somministrata liż-żewġ sessi waqt il-perjodu ta' tghammir u minn hemm 'il quddiem lin-nisa waqt it-tqala u għall-perjodu ta' meta jkunu qed iredgħu mill-halib ta' sidirhom. Għall-amministrazzjoni permezz ta' ġbid minn ġol-pulmuni, il-metodu jirrikjedi modifikazzjoni.

1.5 KRITERJI KWALITATTIVI

Xejn.

1.6 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST*Preparazzjonijiet*

Qabel it-test, annimali zghazagh u b'saħħithom huma assenjati kif ġie għal grupp ta' kontroll. L-annimali huma miżmuma taħt kundizzjonijiet ta' akkomodazzjoni u ikel għall-inqas għal hamest ijiem qabel it-test. Huwa rakkomandat li s-sustanza ittestjata tkun somministrata fid-dieta jew fl-ilma tax-xorb. Tipi oħra ta' amministrazzjoni huma aċċettabbli wkoll. L-annimali kollha għandhom ikunu iddożati bl-istess metodu waqt il-perjodu sperimentali xieraq. Jekk jintużaw xi sustanzi jew addittivi oħrajn li jiffaċilitaw l-ghoti tad-doża, dawn għandhom ikunu magħrufa li ma jipproduċux effetti tossiċi. L-ghoti tad-doża għandu jkun fuq bazi ta' sebat ijiem fil-ġimgħa.



Annimali sperimentali

Selection of species

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

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

Numru u sess

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

L-ghan hu li hu li jkun hemm biżżejjed tqala u frieh biex tkun assigurata valutazzjoni sinifikanti tal-potenzal li għandha s-sustanza biex taffettwa l-fertilità, it-tqala u l-imġieba maternali fl-annimali tal-generazzjoni P u fl-annimali mhux miftumin, fl-iżvilupp u t-tkabbir ta' frieh ta' l-F₁ mill-konċepiment sal-ftim.

Kundizzjonijiet tat-test

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

Livelli ta' doża

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

Test limitu

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

▼B

*Eżekuzzjoni tat-test**Skedi sperimentali*

L-ghoti tad-doża ta' kuljum lill-irġiel parentali (P) għandu jibda meta jkollhom etá ta' madwar hames sa disa ġimgħat, war li jkunu infatmu u akklimatizzati ta' l-iqas għal hamest ijiem. Għall-firien, l-ghoti tad-doża ikompli għal għaxar ġimgħat qabel il-perjodu ta' tghammir (tmien ġimgħat għal grieden). L-irġiel għandhom jinqatlu u eżaminati jew fit-tmien tal-perjodu ta' tghammir jew inkella dawn jinżammu fuq id-dieta tat-test għall-produzzjoni possibbli tat-tieni wild u għandhom jinqatlu u eżaminati fit-tliet qabel it-tmien ta' l-istudju. Għal nisa parentali (P) l-ghoti tad-doża għandu jibda għallinqas wara hamest ijiem ta' akklimatizzazzjoni u jibqa' sejjer almenu għal ġimgħatejn qabel it-tghammir. L-ghoti ta' kuljum tad-doża lin-nisa P għandu jibqa' sejjer matul it-tliet ġimgħat ta' tghammir, it-tqala sal-ftim tal-frieħ F₁. Il-modifikazzjoni ta' l-iskeda ta' l-ghoti tad-doża fuq il-bażi ta' informazzjoni oħra fuq is-sustanza ittestjat, bħal induzzjoni tal-metabolizmu jew bijo-akkumulazzjoni.

Proċedura ta' tghammir

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

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

Dawk il-pari li ma jitghammrux għandhom ikunu evalwati sabiex tiġi definita l-kawża tan-nuqqas ta' fertilità apparenti.

Jista' jkun li din il-valutazzjoni tinvolvi proċeduri bħal li jiġu provduti opportunitajiet oħra sabiex jitghammru ma' nisa jew irġiel oħra, eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi riproduttivi, u eżaminazzjoni taċ-ċiklu ta' saħna sesswali jew ta' spermatogenezi.

Daqsijiet tal-gruppi ta' ulied/frieħ

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

Fejn issir standardizzazzjoni, il-proċedura sussegwenti hi rakkomandata. Bejn l-1 u r-4 gurnata wara t-twelid, id-daqs ta' kull grupp ta' ulied/frieħ jista' jkun irrangat billi jkunu eliminati iż-żgħar żejda b'tali mod li jkun hemm sa fejn hu possibbli, erba' subien u erbghat

ibniet kull grupp ta' ulied/frieħ. Fejn in-numru ta' frieħ subien jew bniet jipprevenu milli jkun hemm erba' minn kull sess għal kull grupp ta' ulied, hu aċċettabbli arrangament parzjali (per eżempju, hames subien u tlett ibniet). L-arrangamenti m'humix applikabbli għall-gruppi ta' ulied/frieħ ta' inqas minn tmien frieħ.

▼B

Osservazzjonijiet

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

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

Il-frieh mejta u dawk sagrifikati għandhom ikunu preservati u studjati għal xi difetti possibbli. Frieh hajjin għandhom jingħaddu u jintiżnu il-gruppi ta' frieh fl-ghodwa ta' wara t-twelid, fir-4 u s-7 ġurnata kif ukoll kull ġimgha minn hemm 'il quddiem sat-tmiem ta' l-istudju, meta l-annimali għandhom jintiżnu individwalment.

Anormalitajiet fiżiċi kif ukoll fl-imġieba osservati fl-ommijiet jew fil-frieh għandhom jiġu rreġistrati.

Patoloġija

Awtopsjja

Fil-hin tas-sagrifiċju jew tal-mewt waqt l-istudju, l-annimali tal-ġenerazzjoni P għandhom jiġu eżaminati makroskopikament għal kwalunkwe anormalitajiet strutturali jew kambjamenti patoloġiċi, b'attenzjoni speċjali tingħata lill-organi tas-sistema riproduttiva. Frieh mejta jew moribondi għandhom jiġu eżaminati għad-difetti.

Istopatoloġija

L-ovarji, l-utru, iċ-ċerviċi, il-vaġina, it-testikoli, il-kanali twal ta' wara l-bajd minn fejn tgħaddi l-isperma, il-bżieqa seminali, il-prostata, il-glandola li tagħqqad, glandola pitwitarja u l-organu(i) immirati ta' l-annimali P kollha għandhom ikunu preservati għal eżaminazzjoni mikroskopika. Fl-eventwalità li dawn l-organi ma kinux eżaminati fi studji oħrajn b'doża multipla, dawn, fejn hu possibbli, għandhom ikunu eżaminati mikroskopikament fl-annimali kollha li juru kambjamenti patoloġiċi kbar. Kif sugġerit fil-proċeduri ta' tgħammir, l-organi riproduttivi ta' l-annimali suspettati b'infertilità jistgħu jkunu sugġetti għal eżaminazzjoni mikroskopika.

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

▼B**2. DATA**

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

Fejn hu possibbli, ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati b'metodu ta' statistika xieraq. kwalunkwe metodu ta' statistika aċċettat jista' jintuża

3. RAPPORTAĠĠ**3.1 RAPPORT TAT-TEST**

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

- speċi/razza użata;
- data tar-rispons tossiku skond is-sess u d-doża, inkluż il-fertilità, it-tqala u l- vijabilità;
- il-hin tal-mewt waqt l-istudju jew jekk l-annimali għex sal-hin tas-sagrifiċċju skedat jew sat-tmiem ta' l-istudju;
- tabella li turi il-piż ta' kull grupp ta' wlied, il-ferż medju u l-piżijiet individwali tal-frieħ fit-tmiem l-istudju;
- effetti tossiċi fuq ir-riproduzzjoni, fuq il-frieħ u l-iżvilupp wara t-twelid;
- il-ġurnata ta' meta ġie osservat kull sinjal anormali u l-imġieba sussegwenti tiegħu;
- id-data ta' piż tal-ġisem għall-annimali P;
- sejbiet nekroskopiċi;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet mikroskopiċi kollha;
- trattament statistiku tar-riżultati, fejn xieraq;
- diskussjoni tar-riżultati;
- interpretazzjoni tar-riżultati.

3.2 VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.

4. REFERENZI

Ara Parti B ta' l-Introduzzjoni Ġenerali.



B.35. STUDJU TAT-TOSSIČITÀ REPRODUTTIVA FUQ ŻEWĠ ĠENERAZZJONIJIET

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika għal OECD TG 416 (2001)

1.1 INTRODUZZJONI

Dan il-metodu għal testijiet riproduttivi fuq żewġ ġenerazzjonijiet huwa iddisinjat li jipprovdi informazzjonni ġenerali li tikkonċernu l-effetti tas-sustanza tat-test fuq l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi ta' l-irġiel u n-nisa, inkluża l-funzjoni gonadali, iċ-ċiklu ta' l-estru, l-imġieba tat-tghammir, il-konċepiment, il-gestazzjoni, il-parturazzjoni, il-lattazzjoni, u l-ftim, u it-rtkabbir u l-iżvilupp tal-wild. L-istudju jista' wkoll jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti tas-sustanza tat-test fuq il-morbidità ta' frieh għadhom jitwieldu, il-mortalità, u d-dettalji preliminari fuq l-iżvilupp tossiku ta' qabel it-twelid u ta' wara t-twelid u jservi bħala gwida għal testijiet sussegwenti. B'zieda ma l-istudju tat-tkabbir u l-iżvilupp tal-ġenerazzjoni F1, dan il-metodu tat-test huwa wkoll intiż li jassessja l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi maskili u femminili kif ukoll it-tkabbir u l-iżvilupp tal-ġenerazzjoni F2. Għal aktar informazzjoni dwar l-iżvilupp tossiku u d-defiċjenzi funzjonali, jew partijiet addizzjonali ta' l-istudju jistgħu inkorporati f'dan il-protokoll, b'konsulta mal-metodi tat-tossiċità ta' l-iżvilupp u/jew in-newrotassiċità ta' l-iżvilupp kif xieraq, jew inkella dawk il-miri finali jistgħu ikunu studjati fi studji separati, bl-użu ta' metodi xierqa tat-test.

1.2 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test hija somministrata f'dożi gradwali lil diversi gruppi maskili u femminili. L-irġiel tal-ġenerazzjoni P għandhom ikollhom id-doża waqt li jkunu jikbru u għal mill-anqas ċiklu spermatogenetiku shih wiehed (madwar 56 jum fil-ġrieden u 70 jum fil-firien) sabiex ikunu misjuba l-effetti ħżiena fuq l-ispermatoġenezi. L-effetti fuq l-isperma huma determinati bin-numru ta' parametri ta' l-isperma (eż. morfologija u l-motilità ta' l-isperma) u l-preparazzjoni tan-nisġiet u histopatologija dettaljata. Jekk dettalji dwar l-ispermatoġenezi jkunu disponibbli minn studju preċedenti dwar doża repetuta ta' tul ta' żmien suffiċjenti, eż. studju ta' 90 jum, l-irġiel tal-ġenerazzjoni P m'humiex meħtieġa li jkunu nkluzi fl-evalwazzjoni. Huwa rakkommandabbli, b'dana kollu, li l-kampjuni jew ir-registrazzjoni diġitali ta' l-isperma tal-ġenerazzjoni P jkunu maħżuna, sabiex jiffaċilitaw evalwazzjoni fil-quddiem. Femminili tal-ġenerazzjoni P għandhom ikollhom id-doża matul it-tkabbir u għal diversi ċikli shaħ ta' l-estru sabiex ikunu żvelati xi effetti ħżiena fuq in-normalità taċ-ċiklu ta' l-estru mis-sustanza tat-test. Is-sustanza tat-test hija somministrata lill-annimali parenti (P) matul it-tghammir, matul it-tqala riziultanti, u matul il-ftim tal-wild tagħhom F1. Fil-ftim, l-amministrazzjoni tas-sustanza jtkompla lejn il-wild F1 matul it-tkabbir tagħhom lejn il-maturità, it-tghammir u l-produzzjoni tal-ġenerazzjoni F2, sakemm il-ġenerazzjoni F2 tkun imfatta.

Osservazzjonijiet kliniċi u l-eżaminazzjonijiet patologiċi huma mwettqa fuq l-annimali kollha għal sinjali tat-tossiċità b'emfasi speċjali dwar l-effetti fuq l-integrità u l-imġieba tas-sistemi riproduttivi maskili u femminili u dwar it-tkabbir u l-iżvilupp tal-wild tagħhom.

▼B**1.3 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST****1.3.1 L-ghażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali**

Il-far huwa l-ispeċje preferut għat-testijiet. Jekk ikunu użati speċje oħrajn, għustifikazzjoni għandha tkun mogħtija u l-modifika xierqa ikunu meħtieġa. Tipi b'fekundità baxxa jew li huma sew magħrufa li għandhom incidenza għolja ta' difetti fl-iżvilupp m'għandhomx ikunu użati. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati għandha tkun minima u ma teċċedix 20 % tal-piż medju ta' kull sess.

1.3.2 Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-ghalf

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C ($\pm$ 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-ghand għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-ghalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistgħu ikunu użati b'forniment mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-ghażla tad-dieta tista' tkun influwenzata bil-htieġa li tkun assigurata inter-tahlita xierqa tas-sustanza tat-test meta somministrata b'dan il-metodu.

L-annimali jistgħu jinżammu individwalment jew li jkunu f'gaġġa bhala grupp żgħir ta' l-istess sess. Il-proċeduri ta' l-akkompanjament għandhom jitwettqu f'gaġġeġ adatti għal dak l-iskop. Wara l-evidenza tal-kopulazzjoni, in-nisa mghammra għandhom jinżammu wahda kull gaġġa fil-gaġġeġ tal-maternità sa kemm iwelldu. Firien mghammra jistgħu wkoll jinżammu fi gruppi żgħat u imbagħad ikunu separati minn jum sa tnejn qabel il-parturazzjoni. L-annimali mghammra għandhom ikunu ipprovduti bil-materjali xierqa u definiti sabiex ikunu jistgħu jippreparaw il-bejta, meta l-parturazzjoni tkun fil-qrib.

1.3.3 Preparazzjoni ta' l-annimali

Annimali b'saħħithom, li jkunu ġew akklamizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mil anqas 5 ijiem u li ma jkunux ġew suġġetti għal proċeduri preċedenti sperimentali, għandhom ikunu użati. L-annimali tat-test għandhom ikunu karatterizzati bhala speċje, razza, sorsi, seww, piż u/jew l-età. Kwalunkwe relazzjonijiet bejn l-aħwa fost l-annimali għandha tkun magħrufa sabiex it-tghammir bejn l-aħwa jkun evitat. L-annimali għandhom ikunu assenjati kif jinzerta lejn il-grupp tal-kuntroll u tat-trattament (stratifikazzjoni bil-piż tal-ġisem hija rakkommandabbli). Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minhabba t-tqegħid fil-gaġġeġ ikunu minimizzati. Kull annimal għandu jkun assenjat numru uniku ta' l-identifikazzjoni. Għall-ġenerazzjoni P, dan għandu jsir qabel ma tibda d-doża. Għall-ġenertazzjoni F1, dan għandu jsir mat-ftim ta' dawk l-annimali li jkunu magħżula għat-tghammir. Reġistri li jindikaw l-origini tal-botom għandhom jinżammu għall-annimali F1 kollha magħżula. B'zieda, identifikazzjoni individwali tal-frieh malajr kemm jista' jkun possibbli malli jitwieldu hija rakkommandabbli, meta l-użin tal-frieh individwali jew tat-testijiet funzjonali jkunu ikkonsidrati.

L-annimali parenti (p) għandhom ikunu f'età ta' madwar 5 sa 9 ġimghat qabel il-bidu tad-doża. L-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom, kemm jista' jkun prattikabbli, ikunu ta' piż u età uniformi.

▼B**1.4 PROCEDURA****1.4.1 In-numru u s-sess ta' l-annimali**

Kull grupp tat-test u tal-kontroll għandu jinkludi numru suffiċjenti ta' annimali sabiex iforni, preferibbilment mhux anqas minn 20 mara tqila, jew qrib tal-parturazzjoni. Għal sustanzi li jikkawgħunaw effetti mhux mixtieqa kif relatati mat-trattament (eż. sterilità, tossiċità eċċessiva f'doża għolja), dan jista' ma jkunx possibbli. L-għan huwa li jipproduċi tqalat biż-żejjed sabiex jassiguraw evalwazzjoni li tagħmel sens dwar il-potenzjal tas-sustanza li taffettwa l-fertilità, it-tqala jew l-imġieba materna u wkoll l-irdiegh, it-tkabbir u l-iżvilupp tal-wild F1 mill-konċepiment sal-maturità, u l-iżvilupp tal-botom tagħhom (F2) sa kemm ikunu mfattma. Għalhekk, nuqqas li jkun milhuq in-numru mixtieq ta' annimali tqal (i.e. 20) mhux neċessarjament jiżvalida l-istudju u għandu jkun evalwat fuq il-bażi ta' każ b'każ.

1.4.2 Preparazzjoni tad-doži

Huwa rakkommandat li s-sustanza tat-test tkun somministrata oralment (ma l-ikel, ma l-ilma tax-xorb, jew b'ikel sfurzat) sakemm rotta oħra ta' l-amministrazzjoni (eż. dermal jew man-nifs) tkun ikkonsiderata aktar xierqa.

Meta meħtieġ, is-sustanza tat-test tkun imdewwba jew sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkommandat li, kull meta possibbli, l-użu ta' tahlita/sospensjoni akwea tkun meqjusa bħala l-ewwel għażla, sewgeita bil-kunsiderazzjoni ta' tahlita/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamhirrum) w imbagħad b'xi tahlita oħra f'mezzi oħrajn. Għal likwidi oħrajn apparti milli l-ilma, il-karatteristiċi tossikoloġiċi tal-likwidu għandhom ikunu magħrufa. L-istabbiltà tas-sustanza tat-test fil-mezz għandha tkun determinata.

1.4.3 Id-Doża

Mill-anqas tlett livelli ta' doži u l-kontroll simultanju għandhom ikunu użati. Sakemm ma tkunx limitata bin-natura fiżiko-kimika jew fl-effetti bioloġiċi tas-sustanza tat-test, l-għola livell ta' doża għandu jkun magħżul bil-għan li jinduċi tossiċità imma mhux il-mewt jew xi sofferenza qawwija. Fil-każ ta' mewt mhux mistennija, l-istudji b'rata ta' mortalità ta' anqas minn madwar 10 fil-mijja fl-annimali parentali (P) tkun normalment xorta wahda aċċettabbli. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżula bil-għan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett hażin mhu osservat (NOAEL). Tnejn- sa erba intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-doži. Għal-studju djetarji, l-ibtervall tad-doża m'għanduk ikun ta' aktar minn tlett darbiet. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa l-informazzjoni eżistenti tat-tossiċità, speċjalment ir-riżultati minn studji repetuti tad-doża. Kwalunkwe informazzjoni disponibbli dwar il-metabolizmu u l-kinetiki tal-kompost tat-test jew tal-materjali relatati għandhom ukoll ikunu ikkonsiderati. Din l-informazzjoni għandha wkoll tgħin fid-demonstrazzjoni ta' l-aġġustament ta' l-amministrazzjoni tad-dożar.

▼B

Dan il-grupp għandu jkun grupp ta' kontroll ittrattat taparsi jew mezz ta' grupp ta' kontroll jekk mezz ikun użat fl-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test. Apparti milli għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ukoll ikunu mqandla b'manjera identika għas-sugġetti tal-grupp tat-test. Jekk ikun użat mezz, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi il-mezz fl-ghola volum użat. Jekk sustanza tat-test hija somministrata ma l-ikel, u tohloq tnaqqis ta' l-ammont djetarju jew ta' l-utilizzazzjoni, allura l-użu ta' grupp ta' kontroll mitmugħa bhala par jista' jkun ikkunsidrat bhala mehtiegħ. L-informazzjoni alternattiv minn studji tal-kontroll iddisinjati għall-evalwazzjoni ta' l-effetti ta' konsum imnaqqas ta' l-ikel fuq il-parametri riproduttivi tista' tkun użata minflok il-grupp konkorrenti li jkunu mitmugħa bhala par.

Konsiderazzjoni għandha tkun mogħtija lil dawn il-karatteristiċi li ġejjin dwar il-mezz jew xi addittivi oħrajn: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu jgħolqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ilma jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.4.4 **Test tal-limitu**

Jekk studju orali fl-livell ta' doża wahda ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/kull jum jew, għall-amministrazzjoni ta' l-ikel jew ilma tax-xorb, persentaġġ ekwivalenti fid-dieta jew fl-ima tax-xorb bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, ma jipproduċu l-ebda effetti tossiċi osservabbli la fl-annimali parentali u l-anqas fil-wild tagħhom u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija kif ibbażata fuq informazzjoni minn komposti strutturament u/jew metabolikament relatati, allura studju shih bl-użu ta' diversi livelli tad-doża jistgħu ikunu meqjusa bhala mhux mehtiegħa. It-test tal-limitu huwa applikabbli apparti minn meta l-eposizzjoni umana tindika il-htiegħa għal doża orali għola fil-livell użat. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma hija l-applikazzjoni manifs jew dermal, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, bħal kemm tinhall, ta' spiss tista' tindika u tillimita l-livell massimu attenibbli ta' l-espożizzjoni.

1.4.5 **Amministrazzjoni tad-doži**

L-annimali għandhom jingħataw id-doża bis-sustanza tat-test fuq il-baži ta' 7-ijiem-fil-ġimgħa. Ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni (ma l-ikel, fl-ilma tax-xorb, jew bi tmiegħ sfurzat) hija preferuta. Jekk rotta oħra ta' l-amministrazzjoni hija użata, ġustifikazzjoni għandha tkun ipprovduta, u l-modifika xierqa jistgħu ikunu mehtiegħa. L-annimali kollha għandhom jingħataw id-doża bl-istess metodu matul il-perjodu sperimentali kif xieraq. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata bi tmiegħ sfurzat, dan għandu jsir bl-użu ta' tubu ta' l-istonku. Il-volum ta' likwidu amministrat f'darba wahda m'għandux jeċċedi 1 ml/100 g piż tal-ġisem (4,4 ml/100 g piż tal-ġisem huwa l-massimu għaž-żejt tal-qamh-ir-rum), apparti milli fil-każ ta' tahlitiet akweji meta 2 ml/100 g piż tal-ġisem jista' jkun użat. Apparti milli għal sustanzi irritanti jew korrossivi, li normalment ikununjizvelaw effetti eżasperanti b'koncentrazzjonijiet għola, varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-koncentrazzjoni sabiex tassigura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Fl-istudju bit-tmiegħ sfurzat, il-frieħ ikunu normalment jirċievu biss is-sustanza tat-test b'mod inderett minn meta jkunu jerdgħu, sakemm id-doża diretta tkun tibda għalihom meta jkunu miftuma. Fl-istudji tat-dieta jew ta' l-ilma tax-xorb, il-frieħ ikunu addizzjonalment jirċievu s-sustanza tat-test direttament meta huma jibdedw jieklu wahedhom matul l-aħħar ġimgħa tal-perjodu tal-lattazzjoni. Għal sustanzi amministrati permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, huwa importanti li jkun assigurat li l-kwantitajiet tas-sustanza tat-test kif involuti ma jkunux jinterferixxu nat-nutrimet normali jew mal-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetarja kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-annimal, jista' jkun użat; il-mod alternattiv użat għandu jkun speċifikat. Għal sustanza somministrata bi tmiegħ sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija

▼B

f'hinijiet simili ta' kull jum, u aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgha sabiex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-ġisem ta' l-animall. Informazzjoni rigward id-distribuzzjoni plaċentali għandha tkun ikkonsiderata meta tkun aġġustata d-doża fi tmiegh sfurzati ibbazzata fuq il-piż.

1.4.6 Skedi sperimentali

Id-doża ta' kull jum ta' l-irġiel u n-nisa parentali (P) għandha tibda meta dawn ikollhom età ta' 5 sa 9 ġimghat. Id-doża ta' kull jum fl-irġiel u n-nisa F1 għandha tibda meta jkunu miftuma; din għandha tkun imfakkra fil-każi ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, espożizzjoni diretta tal-frieh F1 għas-sustanza tat-test tista' dġa tkun seħħet matul il-perjodu tal-lattazzjoni. Għaž-żewġ sessi (P u F1), id-doża għandha tibqa għal mill-anqas 10 ġimghat qabel il-perjodu tat-tgħammir. Id-doża tinżamm kontinwa għaž-żewġ sessi matul il-perjodu ta' ġimghatejn waqt it-tgħammir. L-irġiel għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk u eżaminati meta ma jkunux aktar meħtieġa għall-assessjar ta' l-effetti riproduttivi.

Rigward in-nisa parentali (P), id-doża għandha tinżamm kostanti matul it-tqala u sal-ftim tal-frieh F1. Konsiderazzjoni għandha tinghata għall-modifiki fl-iskeda tad-doża ibbazzati fuq l-informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza tat-test, inkluzi d-dettalji eżistenti tat-tossicità, l-induzzjoni tal-metaboliżmu jew tal-bio-akkumulazzjoni. Id-doża lil annimali individwali għandha normalment tkun ibbazzata fuq id-determinazzjoni tal-piż tal-ġisem kif l-aktar riċenti disponibbli. B'dana kollu, attenzjoni għandha tkun eżerċitata meta tkun aġġustata d-doża matul l-aħħar parti tremestra tat-tqala. It-trattament ta' l-irġiel u n-nisa P u F1 għandha tibqa satterminu. L-irġiel u n-nisa P u F1 adulti kollha għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk meta ma jkunux aktar meħtieġa dwar l-assessjar ta' l-effetti riproduttivi. Il-frieh F1 mhux magħżula għat-tgħammir u l-frieh kollha F2 għandhom ikunu maqtula b'mod umanesk wara li jkunu nfatmu.

1.4.7 Priċedura tat-tgħammir

1.4.7.1 *It-tgħammir parentali (P)*

Għal kull tgħammir, kull mara għandha tkun imqieghda ma raġel wieħed mill-istess livell ta' doża (tgħammir 1: 1) sakemm isehh il-kopulazzjoni jew wara li jkunu skadew 2 ġimghat. Ta' kull jum, in-nisa għandhom ikunu eżaminati għall-preżenza ta' sperma jew ta' buq vaġinali. Il-jum 0 tat-tqala huwa definit bħala l-jum ta' meta tapp vaġinali jew sperma jkunu misjuba. Fil-każ li l-par ma jirnexxix, it-tgħammir mill-ġdid ta' nisa ma rġiel dġa ippruvati ta' l-istess grupp jista' jkun ikkunsidrat. Pari mgħammra għandhom ikunu kjarament identifikati f'dik id-data. It-tgħammir ta' ahwa għandu jkun evitat.

▼B

1.4.7.2 *Tgħammir F1*

Għat-tgħammir ta' l-ulied F1, mill-anqas raġel wiehed u mara waħda għandhom ikunu magħżula mal-ftiem minn kull boton għal tgħammir ma frieh ohrajn ta' l-istess livell ta' doża imma minn boton differenti, sabiex jipproduċu l-ġenerazzjoni F2. L-għażla tal-frieh minn kull boton għandha tkun kif jinzerta meta l-eċċellenza sinifikanti ma jkun osservati fil-piż tal-ġisem jew fid-dehra, bejn is-sieħba fl-istess botom. Fil-każ li differenzi jkun osservati, laħjar rappreżentattivi minn kull botom għandhom ikunu magħżula. B'mod pragmatiku, dan laħjar isir fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem imma jista' jkun aktar xieraq fuq il-bażi ta' l-apparenza. Il-wild F1 m'għandux ikun mghammir sakemm ikunu laħqu l-maturità sesswali kollha. Pari mingħajr proġenità għandhom ikunu evalwati sabiex tkun determinata l-kawża apparenti ta' l-infertilità. Dan jista' jinvolvi tali proċeduri bħala opportunitajiet addizzjonali saniex jitgħammru ma nisa jew irġiel ohrajn li diġa kienu taw provam b'eżaminazzjoni mikroskopika ta' l-organi riproduttivi, u l-eżaminazzjoni cikli ta' l-eteru jew ta' l-ispermatoġenezi.

1.4.7.3 *It-tieni tgħammir*

F'ċerti okkazzjonijiet, bħala ma huma aterazzjoni relatati mat-trattament fid-daqs tal-botom jew fl-osservazzjoni ta' effetti ekwivoku fl-ewwel tgħammir, huwa rakkommandabbli li l-adulti P jew F1 ikunu mghammra mill-ġdid sabiex jipproduċu it-tieni botom. Huwa rakkommandabbli li jkun mghammra mill-ġdid in-nisa u l-irġiel, li ma jkunux iproduċew botom meta mghammra ma ohrajn diġa bi prova mis-sess oppost. Jekk il-produttjoni tat-tieni botom tkun meqjusa bħala meħtieġa f'waħda mill-ġenerazzjonijiet, l-annimali għandhom ikunu m, għammra mill-ġdid fi żmien madwar ġimgħa wara l-ftim ta' l-aħħar botom.

1.4.7.4 *Id-daqs tal-botom*

L-annimali għandhom jithallew li jipproduċu l-botom b'mod normali u li jkabbru t-tfal tagħhom sal-ftim. Standardizzazzjoni tad-daqs tal-botom hija volontarja. Meta ssir l-istandardizzazzjoni, il-metodu użat għandu jkun deskritt fid-dettall.

1.5 OSSERVAZZJONIJET

1.5.1 **Osservazzjonijiet kliniċi**

Osservazzjoni klinika ġenerali għandha ssir ta' kull jum u, fil-każ ta' tmieġ tad-doża b'mod sfurzati, il-hin tiegħu għandu jkun meqjus fl-ghola perjodu antiċipati ta' l-effetti ta' wara d-doża. Tibdiliet fl-imġieba, sinjali ta' parturazzjoni diffiċli jew imtawwla u s-sinjali kollha ta' tossiċità għandhom ikunu irregistrati. B'zieda, eżaminazzjoni aktar dettaljata ta' kull annimal għandha tkun imwettqa fuq bażi ta' mill-anqas darba fil-ġimgħa u tista' tkun imwettqa b'mod konvenjenti fl-okkazzjoni ta' meta l-annimal ikun mizun. Darbejn kull jum, matul tmiem il-ġimgħa darba kull jum, meta xieraq, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u l-mortalità.

▼B**1.5.2 Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/ilma fl-annimali parenti**

L-annimali parentali (P u F1) għandhom ikunu miżuna fl-ewwel jum tad-doża u mill-anqas darba fil-ġimgħa minn hemm il-quddiem. Nisa parentali (P u F1) għandhom ikunu miżuna bħala minimu fil-jiem tal-ġestjoni 0, 7, 14, u 20 jew 21, u matul il-jiem meta jreddgħu jew fl-istess jiem bħal meta jsir l-użin tal-botom u fil-jum ta' meta l-annimali jkunu maqtula. Dawn l-osserbazzjonijiet għandhom ikunu irrapurtati individwalment għal kull annimal adult. Matul il-pperijodi ta' qabel it-tgħammir u tal-ġestjoni, il-konsum ta' l-ikel għandu jkun imkejjel mill-anqas darba fil-ġimgħa. Il-konsum ta' l-ilma għandu jkun imkejjel bħala minimu jekk is-sustanza tat-test tkun somministrata fl-ilma.

1.5.3 Iċ-ċikli esteru

It-tul taċ-ċiklu esteru u n-normalità huma evalwati fin-nisa P u F1 b'tilpisa vaġinali qabel ma jsir it-tgħammir, u l-aħjar waqt it-tgħammir, sakemm tkun instabet evidenza tat-tgħammir. Meta jkunu akkwistati ċ-ċelloli vaġinali ċervikali, attenzjoni għandha tingħata sabiex ikun evitat li ċaqlieq tal-mukuża u sussegwentament, l-induzzjoni ta' pseudo-tqala (1).

1.5.4 Parametri ta' l-isperma

L-irġiel P u F1 kollha, waqt it-terminazzjoni, il-piż tat-testis u ta' l-epididimi għandu jkun irreġistrat u kull wieħed mill-organi preservati għal eżaminazzjoni histopatoloġika (ara s-sezzjoni 1.5.7, 1.5.8.1). Minn subset ta' mill-anqas għaxart irġiel ta' kull grupp P u F1, il-kumplement tat-testes u l-epididimi għandhom ikunu użati għall-enumerazzjoni ta' l-ispermatidi omoġenizzazzjoni-reżistenti u tar-riservi ta' l-isperma tal-cauda epididimali, rispettivamente. Għall-istess subset ta' rġile, l-isperma mill-cauda epididymides jew vas deferens għandhom ikunu miġbura għall-evalwazzjoni tal-motilità ta' l-isperma u l-morfoloġija ta' l-isperma. Jekk l-effetti relatati mat-trattament huma osservati jew meta jkun hemm evidenza minn studji oħrajn ta' effetti possibbli fuq l-ispermatogenezi, l-evalwazzjoni ta' l-isperma tista' tkun imwettqa fuq l-irġiel kollha f'kull grupp ta' doża; altrimenti l-enumerazzjoni tista' tkun ristretta fuq l-irġiel P u F1 tal-kontroll u dawk ta' doża għolja.

In-numru totali ta' spermatidi testikulari reżistenti-omoġenizzazzjoni u l-isperma cauda epididimali għandhom ikunu innumerati (2) (3). Ir-riservi ta' l-isperma cauda jistgħu ikunu derivati mill-konċentrazzjoni u l-volum ta' l-isperma f'sospensjoni użata sabiex ikunu mwettqa kompletament l-evalwazzjonijiet kwalitattivi, u n-numru ta' sperma rkuprat minn tgħaffig u/jew omoġenizzazzjoni sussegwenti tal-kumplement tal-materja cauda. L-enumerazzjoni għandha tkun imwettqa fuq subset magħżul ta' rġiel tal-gruppi ta' dozi kollha immedjetament wara l-qtil ta' l-annimali sakemm ma jkunx hemm ir-rekordings bil-video jew diġitali, jew sakemm il-kampjuni jkunu ffrizati għal analiżi aktar tard. F'dawn il-każi, il-grupp tal-kontrolli u tad-doża għolja għandhom ikunu analizzati l-ewwel. Jekk l-ebda effetti reletati mat-trattament (eż. effetti fuq l-għadd ta' l-isperma, il-motilità, jew il-morfoloġija) jkunu jidhru, il-gruppi tad-dozi l-oħrajn ma jkunx hemm htieġa li jkunu analizzati. Meta l-effetti relatati mat-trattament ikunu innotati fil-grupp ta' doża għolja, allura l-gruppi fid-doża aktar baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati.

▼B

Il-motilità epididimala (jew ductus deferens) għandha tkun evalwata jew irregistrata fuq video immedjetament wara s-sagrifiċju. L-isperma għandha tkun irkuprata waqt li tkun minimizzata l-hsaram u mrattba għall-analiżi tal-motilità bl-użu ta' metodi accettabbli (4). Il-persentaġġ ta' sperma motilment progressiva għandu jkun determinat jew suġġettivament jew inkella oġġettivament. Meta l-analiżi ta' moviment mgħajjun mill-computer hija mwettqa (5) (6) (7) (8) (9) (10) id-derivazzjoni tal-motilità progressive tkun tistrieħ fuq il-ghatbiet definiti bl-użu għal passaġġ ta' veloċità medja u l-linja dritta jew l-indiċi lineari. Jekk il-kampjuni jkun għew fotografi fuq videotape (11) jew l-immapini ikunu b'mod ieħor registrati fil-waqt tan-nekropsija, analiżi sussegwenti biss ta' l-irġiel P u F1 tal-kontroll u ta' doża għolja tista' tkun imwettqa, sakemm ma jkunx osdservati l-effetti relatati mat-trattament; f'dak il-każ, il-gruppi tad-doża l-baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati. Fin-nuqqas ta' imaġġini video jew diġitali, il-kampjuni kollha fil-gruppi tat-trattament għandhom ikunu analizzati man-nekropsija.

Evalwazzjoni morfologika tal-kampjun ta' l-isperma epididimali (jew van deferens) għandha tkun imwettqa. L-isperma (jew mill-anqas 200 kull kampjun) għandha tkun eżaminata kif stabbilita, preparazzjonijiet niedja (12) u klassifikata bħala jew normali in annormali. L-eżempji ta' l-annormalitajiet ta' l-isperma morfologika jkunu jindikaw fużjoni, irjus iżolati, u rjus u/jew denb mingħajr forma. L-evalwazzjoni għandha tkun imwettqa fuq subiet ta' rġile magħzula fil-gruppi tad-doži kollha jew immedjetament wara l-qtil ta' l-annimali, jew, ibbazati fuq ir-rekordings tal-video jew diġitali, f'hin aktar tard. It-tiċpis, la darna stabbilit, jista' wkoll ikun moqri aktar tard. F'dawn il-każi, il-grupp tal-kontrolli u tad-doża għolja għandhom ikunu analizzati l-ewwel. Jekk l-ebda effetti reletati mat-trattament (eż. effetti fuq l-ghadd ta' l-isperma, il-motilità, jew il-morfologija) jkunu jidhru, il-gruppi tad-doži l-oħrajn ma jkunx hemm hteġa li jkunu analizzati. Meta l-effetti relatati mat-trattament ikunu innotati fil-grupp ta' doża għolja, allura l-gruppi fid-doża aktar baxxa għandhom ukoll ikunu evalwati.

Jekk uħud mill-parametri ta' hawn fuq dwar l-evalwazzjoni ta' l-isperma jkunu diġa għew eżaminati bħala parti minn studju sistematiku tat-tossicità ta' mill-anqas 90 jum, dawn ma jkunu neċċessarjament jehtieġu li jkunu repetuti fl-istidju ta' żewġ generazzjonijiet. l-kampjuni jew ir-registrazzjoni diġitali ta' l-isperma tal-geberazzjoni P jkunu mahżuna, sabiex jiffaċilitaw evalwazzjoni fil-quddiem.

1.5.5

Il-wild

Kull botom għandu jkun eżaminat malajr kemm jista' jkun possibbli wara l-hlas (jum tal-attazzjoni 0) sabiex ikun stabbilit in-numru u s-sess tal-frieħ, imweldin mejta, imweldin hajjin, u il-preżenza ta' annomalitajiet kbar. Frieħ misjuba mejta fil-jum), jekk mhux maċerati, għandhom preferibbilment ikunu eżaminati għal difetti possibbli u l-kawża tal-mewt, u għandhom ikunu preservati. Frieħ hajjin għandhom ikunu magħduda u miżuna individwalment mat-twelid (jum 0 tal-lattazzjoni) jew fil-jum 1, u fil-jiem regolati ta' l-użin minn hemm il-quddiem, eż. fil-jiem 4, 7, 14, u 21 tal-lattazzjoni. Annomalitajiet fiżiċi jew ta' l-imġieba osservati fl-ommijiet jew fil-frieħ għandhom ikunu registrati.

▼B

L-izvilupp fiziku tal-frieh għandu jkun irregistrat l-aktar biż-żieda fil-piż tal-ġisem. Parametri fiżiċi oħrajn (eż. il-fetha ta' l-ghajnejn u l-widnejn, il-hruġ tas-snien, it-tkabbir tax-xagħar) jista' jformi informazzjoni supplementari, imma dawn id-dettalji għandhom preferibbilment ikunu evalwati fil-kuntest tad-dettalji tal-maturità sesswali (eż. l-età u l-piż tal-ġisem jew il-fetha vaġinali jew is-separazzjoni balano-preputial) (14). Investigazzjonijiet funzjonali (eż. attività motorili, funzjoni sensorja, ontogenija relfettiva) tal-ferh F1 qabel u/jew wara l-ftim, partikolarment dawk relatati mal-maturità sesswali, huma rakkommandati jekk tali investigazzjonijiet ma jkunux inkluzi fi studju separati. L-età tal-ftuħ vaġinali u s-separazzjoni prepuzjali għandha tkun determinata għal dawk imfatma F1 magħzula għat-tghammir, Distanza anogenitali għandha tkun imkejla fil-jum 0 ta' wara t-twelid fil-frieh F2 jekk istigata b'alterazzjonijiet fir-relattività tas-sess F1 jew bil-kalkolu tal-maturità sesswali.

Osservazzjonijiet funzjonali jistgħu ikunu mħollija barra fi gruppi li altrimentri jiżvelaw sinjali ċari ta' effetti hżiena (eż. tnaqqis sinifikanti fl-akkwist tal-piż, eċċ.). Jekk l-investigazzjonijiet funzjonali jkunuw mwettqa, dawn m'għandhomx isiru fuq il-frieh magħzula għat-tghammir.

1.5.6 Nekropsija maġġuri

Fil-waqt tat-terminazzjoni jew tal-mewt matul l-istudji, l-annimali parentali kollha (P u F1), il-frieh kollha b'annormalitajiet esterni jew sinjali kliniċi, kif ukoll wiehed magħżul b'mod kif jinzerta, ferh/sess/bottom, miż-żewġ generazzjonijiet F1 u F2, għandu jkun eżaminat b'mod makroskopiku għal xi annormalitajiet strutturali jew tibdil patoloġiku. Attenzjoni speċjali għandha tingħata lill-organi tas-sistema riproduttiva. Il-frieh li jinqatlu b'mod umanesk f'kundizzjoni morbonda u l-frieh mejta, meta ma jkunux maċerati, għandhom ikunu eżaminati għal difetti possibbli u/jew il-kawża tal-mewt, u ippreservati.

L-uteri tan-nisa li jkun għadhom mhux mghammra għandhom ikunu eżaminati, f'tali manjara li ma tikkompromettix l-evalwazzjoni histopatoloġika, għall-preżenza u n-numru ta' siti ta' l-implantazzjoni.

1.5.7 Il-piż ta' l-organi

Fil-waqt tat-terminazzjoni, il-piż tal-ġisem u l-piż ta' dawn l-organi li ġejjin fl-annimali P u F1 parentali kollha għandu jkun determinat (l-organi bħala pari għandhom ikunu miżuna individwalment):

- l-utru, l-ovarji;
- it-testi, l-epididimidi (total u cauda);
- il-prostata';
- il-buzzieqa seminali bil-glandoli koagjulanti u l-fluwidi tagħhom u l-prostata (bħala unità wahda);
- il-mohħ, il-fwied, il-kliewi, il-milsa, il-glandola pitwarja, it-tirojde u l-glandoli adrenali u dawk l-organi fil-mira kif maagħrufa.

Il-piżijiet ta' l-iġsma fit-terminazzjoni għandhom ikunu determinati għall-frieh F₀ u F₂ li huma magħzula għan-nekropsija. Dawn l-organi li ġejjin minn ferh/sess/bottom magħzula kif jinzerta (ara s-sezzjoni 1.5.6) għandhom ikuinu miżuna.

▼B

Il-moħħ, il-milsa u t-timu. Ir-riżultati tan-nekropsija ġenerali u l-piż ta' l-organi għandhom ikunu assessjati fil-kuntest ma l-osservazzjonijiet magħmula fi studji oħrajn ta' dozi repetuti, meta praktikabbli.

1.5.8 **Histopatoloġija**1.5.8.1 *Annimali parentali*

L-organi u l-bicċiet li ġejjin ta' l-annimali parentali (P u F1), jew il-kampjuni rappreżentattivi tagħhom, għandhom ikun stabbiliti u mahżuna f'medja xierqa għall-eżaminazzjoni histopatoloġika.

— il-vaġina, l-utru bil-ghonq, u l-ovarji (ippreservati ġo fissant xieraq);

— waħda mit-testi (ippreservata fil-fissattiv Bouis jew komparabbli), waħda minn haġa: epididima, l-borża seminali, l-prostata, u l-glandola koagjulanti;

— oragnum(i) tal-mira preċedentament identifikati mill-annimali kollha P u F1 li huma magħżula għat-tgħammir.

Histopatoloġija shiha tal-organi u l-bicċiet presevati elenkati hawn fuq għandha tkun imwettqa għad-dozi l-gholjin kollha u l-annimali P u F1 magħżula għat-tgħammir. L-eżaminazzjoni ta' l-ovarji fl-annimali P hija volontarja. L-organi li juru tibdiliet relatati mat-trattament għandhom ukoll ikunu eżaminati fil-gruppi tad-doża l-baxxa u l-medja sabiex jgħinu fl-elucidazzjoni tal-NOAEL. B'zieda, l-organi riproduttivi fl-annimali tad-doża baxxa u medja li huma issuspettati b'fertilità mnaqqa, eż. dawk li ma jirnexxilhomx jitgħammru, li jkunu tqal, l-irġiel li ma jimpregnawx, jew li jwelledu frieh b'saħħithom, jew dawk li ċ-ċiklicità estera jew in-numru ta' l-isperma, l-motilità, jew il-mofoloġija tagħhom kienet affettwata, għandhom ikunu suġġetti għal evalwazzjoni histopatoloġika. Il-ferita kbar kollha bħal ma huma l-atrofija jew it-tumuri għandhom ikunu eżaminati.

Eżaminazzjoni histopatoloġika testikulati dettaljata (e.g. bl-użu tal-fissattiv Bouin, it-twaħħil billi paraaffin u s-sezzjonijiet transersjali ta' 4-5 µm ħxuna) għandhom ikunu mwettqa sabiex ikunu identifikati l-effetti relatati mat-trattament bħal ma huma l-ispermatici miżmuma, is-saffi jew it-tipi nieqsa mil-ġermi taċ-ċelloli, iċ-ċelloli kbar multinukleati jew it-tgħaffiġ taċ-ċelloli spermatogeniċi fil-lumen (14). L-eżami ta' l-epididimi intatta għandu jinkludi il-kaput, il-korp u l-kaanula, li jista' jkun imwettaq bl-evalwazzjoni tas-sezzjoni longitudinali. L-epididimi għandha tkun evalwata għall-infiltrazzjoni lewkoċita, tibdil fil-prevalenza tat-tipi taċ-ċelloli, it-tipi ta' ċelloli aberrenti, u l-isperma patoġikitożi. Il-PAS u t-tbghajja hematossilini jistgħu ikunu użati għall-eżaminazzjoni ta' l-organi riproduttivi maskili.

L-ovarju postlaktatjonali għandu jkollu l-folliki primordjali u tat-kabbir kif ukoll il-corpora lutea l-kbira tal-lattazzjoni. L-eżaminazzjoni histopatoloġika għandha tiżvela t-tnaqqis kwalitattiv tal-popolazzjoni tal-folliki primordjali. Evalwazzjoni kwantitattiva tal-folliki primordjali għandha tkun imwettqa għall-femminili F1; in-numru ta' l-annimali, l-ghazla tas-sezzjoni ovarja, u s-sezzjoni tad-daqs tal-kampjun għandha tkun statistikament xierqa għall-proċedura ta' l-evalwazzjoni użata. L-eżaminazzjoni għandha tinkludi l-enumerazzjoni tan-numru tal-folliki primordjali, li jistgħu ikunu aggruppati mal-folliki ż-żgħar tat-tkabbir, għal paragun ta' l-ovarji ittrattati u tal-kontroll (15) (16) (17) (18) (19).

▼B1.5.8.2 *Frieħ mhux miftuma*

Il-partijiet ferm annormali u l-organi tal-mira mill-frieħ kollha b'annormalitajiet esterni jew sinjali kliniċi, kif ukoll minn wiehed mill-grupp ferħ/sex/bottom magħżul kif jinzerta miż-żewġ ġenerazzjonijiet F1 u F2 li ma jkunx ġew magħżula għat-tghammir, għandhom ikunu iffissati u maħġżuna f'medja xierqa għall-eżaminazzjoni histopatoloġika. Il-karatteristika shiha histopatoloġika tal-partijiet ippreservati għandha tkun imwettqa b'enfasi speċjali dwar l-organi tas-sistema riproduttiva.

2. **DATA**

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Id-dettalji għandhom ikunu irrapurati individwalment għan-nisa kif ukoll għall-wild tagħhom u miġbura b'sommarju f'għamla tabulari, li juru għal kull grupp tat-test u għal kull ġenerazzjoni, in-numru ta' l-annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' l-annimali misjuba mejta matul it-test jew maqtula għal raġunijiet umanitarji, il-hin ta' xi mewt jew qtil umanitarju, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' l-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità kif osservati, inkluz il-hin ta' meta tkun skoppjat, it-tul ta' żmien, u s-severità ta' xi effetti tossiċi, it-tiġ ta' l-osservazzjonijiet ta' l-embrijuni/feti, u l-informazzjoni l-oħra kollha dwar it-trabi l-oħrajn.

Metodu statistiku generalment aċċettabbli għandu jkun użat' il-metodi statistiċi għandhom ikunu magħżula bhala parti mid-disinn għall-istudju u għandhom ikunu iġġustifikati. Il-mudelli statistiċi bir-reazzjoni tad-doża jistghu ikunu utili għad-data ta' l-analizi. Ir-rapport għandu jinkludi informazzjoni suffiċjenti dwar il-metodu ta' l-analizi u l-programm tal-kompjuter użat, hekk li riveditur/statistiku indipendenti jkun jista' jevalwa mill-ġdid u jikkostitwixxi mill-ġdid l-analizi.

2.2 EVALWAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Is-sejbiet ta' dan l-istudju tat-tossiċità riproduttiva fuq żewġ ġenerazzjonijiet għandu jkun evalutat f'termini ta' l-effetti osservati, inkluzi s-sejbiet tan-nekropsija u mikroskopiċi. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni, jew in-nuqqas tagħha, bejn id-doża u s-sustanza tat-test u l-preżenza jew l-assenza, l-inċidenza jew is-severità ta' l-annormalitajiet, inkluzi l-feriti kbar, l-organi tal-mira identifikati, il-fertilità affettwata, l-annormalitajiet kliniċi, l-imġieba tar-riproduzzjoni u l-bottom affettwati, it-tibdiliet fil-piż tal-ġisem, l-effetti fuq il-mortalità u xi effetti tossiċi oħrajn. Il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, u meta disponibbli, id-dettalji tossikokinetiċi għandhom ikunu meqjusa fil-kunsiderazzjoni meta jkunu evalutati r-riżultati tat-test.

Test tat-tossiċità riproduttiva imwettqa kif suppost għandu jipprovi estimi sodisfaċenti tal-livell bla ebda effett u rikonossiment ta' l-effetti ħżiena fuq ir-riproduzzjoni, l-parturizzjoni, il-lattazzjoni, l-iżvilupp postnatli inkluz it-tbakkir u l-iżvilupp sesswali.

▼B**2.3 INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

Studju tat-tossicità riproduttiva fuq żewġ generazzjonijiet għandu jipprovi informazzjoni dwar l-effetti ta' l-espożizzjoni ripetuta ta' sustanza matul il-fażijiet kollha ta' ċiklu riproduttiv. Partikolarment, l-istudju jipprovi informazzjoni dwar il-parametri riproduttivi, u dwar l-iżvilupp, it-tlabbir, il-maturità u s-sopravvivenza tal-frieħ. Ir-riżultati ta' l-istudju għandhom ikunu interpretati b'konnessjoni mas-sejbier mill-istudji subkroniku, riproduttivi, tossikokinetiċi u studji oħrajn. Ir-riżultati ta' dan l-istudju jistgħu ikunu użati fl-assessjar tal-htieġa ta' aktar testijiet tal-kimika. L-estrapolazzjoni tar-riżultati ta' l-istudju mal-bniedem hija valida sa grad limitat. Dawn huma l-aħjar użati sabiex jipprovi informazzjoni dwar il-livelli-mingħajr-effett u l-espożizzjoni umana (20) (21) (22) (23).

3. RAPPORTAĠĠ**3.1. RAPPORT TAT-TEST**

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

Is-sustanza tat-test:

- in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;
- dettalji ta' l-identifikazzjoni;
- purità.

Mezz (jekk applikabbli):

- ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz, jekk mhux sempliċement ilma.

Annimali tat-test:

- speċje/tipi użati;
- in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;
- is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, eċċ.;
- il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

- ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;
- dettalji tat-test tal-preparazzjoni tal-formulazzjoni/dieta tas-sustanza, il-konċentrazzjonijiet;
- l-istabbiltà u l-omoġenità tal-preparazzjoni;
- dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;
- skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-konċentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali 9 mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

▼B

Riżultati:

- il-konsum ta' l-ikel. Il-konsum ta' l-ilma, jekk disponibbli, l-effikaċja ta' l-ikel (iż-żieda fil-piż tal-ġisem għal kull gramma ikel ikkunsmat), u l-konsum tal-materjal tat-test għall-annimali P u F1, apparti milli għall-perjodu tal-koabitazzjoni u għal mill-anqas l-aħħar terz tal-lattazzjoni;
- id-dettalji ta' l-assorbazzjoni (jekk disponibbli);
- id-dettalji tal-piż tal-ġisem dwar l-annimali P u F1 magħżula għat-tgħammir;
- id-dettalji tal-piż tal-botom u l-frieħ individwali;
- il-piż tal-ġisem fil-waqt li jkunu sagrafikati u l-piż assolut u rrelattiv ta' l-organi għall-annimali parentali;
- in-natura, s-severità u t-tul ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (sew jekk reversibbli u anki jekk le);
- il-jum tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali jkunux baqgħu hajjin sakem maqtula;
- dettalji tar-reazzjoni tossika bis-sess u d-doża, inklużi l-indiċi tat-tgħammir, il-fertilità, il-ġestazzjoni, it-twelid, il-vijabbilità, u l-lattazzjoni; ir-rapport għandu jindika n-numri użati fil-kalkoli ta' dawn l-indiċi;
- l-effetti tossiċi jew oħrajn fuq ir-riproduzzjoni, il-frieħ, it-tbabbir ta' wara t-twelid, eċċ.;
- is-sejbiet tan-nekropsija;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet histopatoloġiċi kollha;
- in-numru ta' nisa P u F1 fiċ-ċiklu normali u t-tul taċ-ċiklu;
- it-total tan-numru ta' l-isperma cauda epididimali, il-persentaġġ progressive tal-motilità ta' l-isperma, il-persentaġġ morfoloġikament normali, u l-persentaġġ ta' l-ispetma b'kull annormalità identifikata;
- iż-żmien satotgħammir, inklużi n-numru ta' jiem sakem isir it-tgħammir;
- it-tul tal-ġestjoni;
- in-numri ta' l-impjantazzjonijiet, corpora lutea, id-daqs tal-botom;
- in-numru ta' twelid hajjin u t-telf tal-post-impjantazzjoni;
- in-numru ta' frieħ b'annormalitajiet ferm vizibbli, jekk determinati bin-numru tal-botom, għandu jkun irrapportat;
- dettalji dwar l-aċċenni fiżiċi fil-frieħ u l-informazzjoni l-oħra ta' l-iżvilupp post natali; laċċenni fiżiċi evalwati għandhom ikunu ġustifikati;
- dettalji dwar l-osservazzjonijiet funzjonali fil-frieħ u l-adulti, kif applikabbli;
- trattamentv statistiku tar-riżultati, meta xieraq.

▼B

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet, inklużi l-valuri NOAEL għall-effetti materni u fuq il-frieħ.

4.

REFERENZI

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.
- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39-44.
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237-244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
- (9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401-415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.
- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298-303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. et al., (1989). Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
- (17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

- (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379-383.
- (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- (22) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼ M4

B.36. TOSSIKOKINETIĊI

DAHLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti ghat-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-koncentrazzjoni jew id-doża mat-tossiċità osservata u bħala għajnuna biex jinftehem il-mekkaniżmu tagħha ta' tossiċità. TK tista' tgħin biex jinftehem l-istudji tas-tossikoloġija billi turi li l-annimali tat-test ikunu esposti b'mod sistematiku għall-kimika għall-ittestjar u billi tizvela 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 metaboliti 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 htigijiet differenti dwar il-kejl ta' punti ta' tmiem u parametri relatati ma' tossikokinetika għal klassijiet differenti ta' kimiċi (eż. pesticidi, biċċidi, kimiċi industrijali). Mhux bħal Metodi ta' Ttestjar kważi kollha dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar ta' tossikokinetika, li jinvolvi kejljiet u punti ta' tmiem multipli. Fil-gejjieni jistgħu jkunu żviluppati diversi Metodi ta' Ttestjar godda 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 htigijiet ta' kull sistema regolatorja.

▼ M4

7. Hemm diversi studji li jistgħu jsiru biex tkun ivvalutata l-imġiba ta' TK ta' kimika għall-ittestjar għal finijiet regolatorji. Izda, skont il-htigijiet 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 jeħtieġu jiġi esplorat biex ikun indirizzat thassib dwar perikli u riskji assoċjati ma' kimika għall-ittestjar. F'xi sitwazzjonijiet, dejta dwar TK tista' tingabar bħala parti mill-evalwazzjoni fi studji oħra ta' tossikoloġija. Għal sitwazzjonijiet oħra, jistgħu jkunu meħtieġa studji addizzjonali u/jew aktar estensivi dwar TK, skont htigijiet regolatorji u/jew jekk jinqalghu mistoqsijiet godda 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 tissaħħah 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, bhal koefċjent 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. Izda d-dejta miksuba minn studju B.36 tista' tipprovi informazzjoni ta' sfond biex tiggwida t-tifsila ta' studji speċifiċi għal dawn l-investigazzjonijiet. Dan il-Metodu ta' Ttestjar mhux mahsub għall-ittestjar ta' nanomaterjali. Rapport dwar eżami mill-gdid 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. metabolizmu, bilanċ ta' piż, proċeduri analitiċi, tiftix ta' doża, eżalazzjoni ta' CO₂, eċċ.). Karatterizzazzjoni ta' xi whud minn dawn il-parametri tista' ma għibx il-htieġa tal-użu ta' kimiċi b'tikketta radjoloġika.

▼ **M4****Għażla ta' annimali***Speċijiet*

13. L-ispeċi ta' annimali (u razza) użata għal ittestjar ta' TK għandha preferibbilment tkun l-istess bħal dik użata fi studji tossikoloġiċi oħra magħmulin bil-kimika għall-ittestjar ta' interess. Normalment għandu jintuża l-far minhabba 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 tinghata ġustifikazzjoni għall-għażla tal-ispeċi ta' annimal u razzu.
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 żgħażaġh f'saħħithom (normalment minn 6-12-il ġimgħa meta jsir id-dożaġġ) (ara wkoll il-paragrafi 13 u 14). Għandha tinghata ġustifikazzjoni għall-użu ta' annimali li ma jkunux adulti żgħażaġh. L-annimali kollha għandhom ikunu tal-istess età mal-bidu tal-istudju. Il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali individwalment m'għandhiex tkun aktar minn $\pm 20\%$ 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 wiehed għal kull doża ttestjata. Għandha tinghata ġustifikazzjoni għas-sess tal-annimali użat. Għandu jitqies l-użu taż-żewġ sessi (erba' rġiel u erba' nisa) jekk ikun hemm evidenza li s-sostni differenzi sustanzjali fit-tossiċità b'rabta mas-sessi.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf

17. L-annimali ġeneralment għandhom jitqieghdu jghixu 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 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) 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 minghajr tikketta,

— l-ispeċifità u s-sensittività analitiċi tal-metodu użat ma' kimika għall-ittestjar mhux radjuattiva jkunu daqs jew akbar minn dawk li jkunu jistgħu jinkisbu bil-kimika għall-ittestjar b'tikketta radjoloġika,

▼ M4

f'dak il-każ ma jkunx hemm hteġa 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 titneħhiex metabolikament bħala CO₂, u ma ssirx parti mill-ġemgħa ta' karbonju biss tal-organizmu). Tikkettar ta' siti multipli jew reġjuni speċifiċi tal-molekula jistgħu jkunu meħtieġa biex ikun segwit x'jigri 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 stabbli 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 giet identifikata, għandhom ikunu rrappurtati. Programmi regolatorji individwalment jistgħu jagħzlu li jipprovdut gwida addizzjonali bħala għajjuna għad-definizzjoni u l-ispeċifikazzjonijiet ta' kimiċi għall-ittestjar magħmulin minn tahlitiet u metodi għad-determinazzjoni tal-purezza.

Għażla ta' doża

Studju Pilota

20. Is-soltu doża orali wahda tkun suffiċjenti għall-istudju pilota. Id-doża m'għandhiex tkun tossika, iżda tkun għolja biżżejjed biex tithalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u plazma, skont il-każ), kif ukoll biex jiġi jithares l-għan dikjarat tal-studju pilota kif innotat fil-paragrafu 12 ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Studji Ewlenin

21. Għall-istudji ewlenin, ikun ippreferut minimu ta' żewġ doži minhabba li informazzjoni miġbura minn mill-anqas żewġ gruppi ta' doża tista' tghin biex tkun stabbli doża fi studji oħra dwar tossiċità, u tghin fil-valutazzjoni ta' doża-rispons ta' testijiet ta' tossiċità diġà disponibbli.
22. Meta jkunu amministrati żewġ doži, iż-żewġ doži għandhom ikunu għoljin biżżejjed biex tithalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u fil-plazma, 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 taht l-istima ta' LD₅₀ (rotot orali u dermal) jew LC₅₀ (rotta tal-inalazzjoni) jew taht il-valur aktar baxx tal-stima tal-firxa ta' tossiċità akuta. Id-doża aktar baxxa għandha tkun xi frazzjoni tad-doża oghla.
23. Jekk ikun investigat livell wiehed ta' doża, idealment id-doża għandha tkun għolja biżżejjed biex tithalla ssir identifikazzjoni ta' metaboliti fl-eskreta (u fil-plazma, skont il-każ), filwaqt li ma tkunx prodotta tossiċità li tkun tidher. Għandu jkun ipprovdut motiv għala ma jkunx gie inkluz it-tieni livell ta' doża.
24. Jekk l-effett ta' doża fuq proċessi kinetiċi jkun jeħtieġu jiġi stabbilit, żewġ doži jistgħu ma jkunux suffiċjenti u mill-anqas doża wahda għandha tkun għolja biżżejjed biex tissatura daww il-proċessi. Jekk l-erja taht il-kurva tal-plazma ta' konċentrazzjoni-hin (AUC) ma tkunx lineari bejn żewġ livelli ta' doża użati fl-istudju ewleni, din tkun indikazzjoni qawwija li tkun qed issehh saturazzjoni ta' proċess kinetiku wiehed jew aktar xi mkien bejn iż-żewġ livelli ta' doża.

▼M4

25. Għal kimiċi għall-ittestjar ta' tossiċità baxxa, għandha tintuża doża massima ta' 1 000 mg/kg tal-piż tal-ġisem (rotot orali u dermali) (jekk l-amministrazzjoni tkun bir-rotta tal-inalazzjoni, irreferi għall-Kapitolu B.2 ta' dan l-Anness għal gwida; tipikament din id-doża ma tkunx taqbeż 2 mg/l). Konsiderazzjonijiet speċifiċi għal kimika jistgħu jgħid li l-htieġa ta' doża oġġla skont l-htieġiet regolatorji. Għażla ta' doża għandha dejjem tkun iġġustifikata.
26. Dejta dwar doża wahda 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' enzimi) 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 tinhall jew tiġi sospiża b'mod omogenju 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 tahlita 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 wiehed 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 roditori. Volumi ta' vejjikoli użati għal aktar kimiċi għall-ittestjar lipofiliċi jistgħu jibdw 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 wahda (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 mahlula 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 irregistrata u standardizzata fost l-annimali, sakemm tintuża pompa tal-infużjoni. Għandha tintuża l-anestezija jekk wiehed idahhal tubu rqiq fil-vina ġugulari (għal amministrazzjoni ta' kimika

▼ M4

għall-ittestjar u/jew għal għbir ta' demm) jew jekk wiehed juża l-arterja femorali għal amministrazzjoni. Għandha titqies bir-reqqa t-tip ta' anestezija minhabba li din tista' jkollha effetti fuq it-tossikokinetika. L-annimali għandhom jiġihallaw jirkupraw b'mod adegwat qabel amministrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar flimkien mal-vejjikolu.

30. Jistgħu japplikaw rotot ohra ta' amministrazzjoni, bħal dawk dermali u ta' inalazzjoni, (ara l-paragrafi 74-78) għal ċerti kimiċi għall-ittestjar, meqjusin il-proprietajiet fizikokimiċi tagħhom u l-użu jew espożizzjoni umana mistennija tagħhom.

Kejlġiet*Bilanċ tal-massa*

31. Il-bilanċ tal-massa huwa ddeterminat bl-għadd tal-perċentwali tad-doża (radjuattiva) amministrata li tohrogħ fl-awrina, fir-rawt u man-nifs, u bil-perċentwali li jkun hemm f'tessuti, karkassa residwali u hasil ta' gaġeġ (ara l-paragrafu 46). Generalment, 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 htieġa ta' investigazzjonijiet ulterjuri. Dawn l-istudji jistgħu jikkomprenđu 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'wahda 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 jinbada studju dwar eskrezzjoni ta' bili, tipikament tintuża r-rotta orali. F'dan l-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 wahda 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 jehtieġ biex issir stima tal-perċentwali tad-doża amministrata li tkun haġeġ bħala eskreta permezz ta' din ir-rotta, li tista' tintuża biex ikun ikkalkulat direttament kemm ikun sar assorbiment orali, kif ġeġ:

$$(\text{arja ta' teħid tan} - \text{nifs} + \text{urine} + \text{'il barra})$$

$$\text{Assorbiment ta' perċentwali} = \frac{+\text{karkassa mingħajr kontenuti tas} - \text{sistema GI}}{\text{ammont amministrat}} \times 100$$

34. Għal xi klassijiet ta' kimika għall-ittestjar, sekrezzjoni diretta tad-doża assorbita tista' sseħħ f'membrani intestinali kollha. F'każijiet bħal dawn il-kejl ta' perċentwali ta' doża f'rawt wara doża orali lill-far b'tubu rqiq fil-kanal tal-bili ma jitqisx li jkun rappreżentattiv tad-doża mhux assorbita. Huwa rrakkomandat li fejn ikun mahsub li sseħħet sekrezzjoni intestinali, f'dak il-każ il-perċentwali ta' doża assorbita tkun ibbażata fuq l-assorbiment ikkalkulat mill-paragun tal-eskrezzjoni, wara li tkun saret ir-rotta orali, mar-rotta IV (far intatt jew b'tubu rqiq fil-kanal tal-bili) (ara l-paragrafu 35). Huwa rrakkomandat ukoll li meta jitqies li tkun meħtieġa l-kwantifikazzjoni tas-sekrezzjoni intestinali, jitkejjel il-far b'tubu rqiq fil-kanali tal-bili wara amministrazzjoni ta' doża IV.

▼ M4

Disponibbiltà bijoloġika

35. Id-disponibbiltà bijoloġika tista' tkun iddeterminata mill-kinetika tal-plażma/tad-demmm mill-gruppi orali u IV, kif deskritti fil-paragrafi 50-52, b'analizi 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:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (Dose_{\text{IV}}/Dose_{\text{exp}})$$

fejn 'AUC' tkun l-erja taħt il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-hin, u 'exp' tkun ir-rotta sperimentali (orali, dermal jew permezz ta' inalazzjoni).

36. Għal użu f'valutazzjoni tar-riskju ta' effetti sistemici, id-disponibbiltà bijoloġika tal-komponent tossiku tkun ġeneralment ippreferuta flok l-assorbiment ta' perċentwali meta konċentrazzjonijiet sistemici minn studji dwar annimali jitqabblu ma' dejta analoga ta' monitoraġġ bijoloġiku minn studji dwar espożizzjoni ta' haddiema. Is-sitwazzjoni tista' ssir aktar kumplessa jekk dozi jkunu fil-firxa mhux lineari; għalhekk huwa importanti li tgħarbil tossikokinetiku jiddetermina dozi 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 wiehed 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-doza totali (radjuattiva) f'tessuti kif ukoll ta' karkassa residwali għandhom mill-anqas jitkejl fuq fit-tmiem tal-esperiment ta' eskrezzjoni (eż. tipikament sa 7 ijiem wara doza jew anqas skont x'taġhmel speċifikatament kimika għall-ittestjar). Meta ma tinstab ebda kimika għall-ittestjar f'tessuti fi tmiem ta' studju (eż. minhabba li l-kimika għall-ittestjar setgħet kienet eliminata qabel intemm l-istudju minhabba nofs haġja qasira), għandha tingħata attenzjoni biex ma jkunx hemm interpretazzjoni hażina tad-dejta. F'dan it-tip ta' sitwazzjoni, id-distribuzzjoni ta' tessuti għandha tkun investigata fil-mument tal-konċentrazzjoni massima tal-plażma/tad-demmm 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' hin jista' jkun meħtieġ biex jiddetermina d-distribuzzjoni ta' tessuti tal-kimika għall-ittestjar u/jew tal-metaboliti tagħha, biex jevalwa d-dipendenza fuq il-hin (fejn xieraq), biex jgħin biex ikun stabbilit bilanċ ta' massa u/jew skont kif ikun meħtieġ minn awtorità kompetenti. It-tessuti li għandhom jingħabru jinkludu l-fwied, ix-xaħam, is-sistema GI, il-kilwa, il-milsa, id-demmm kollu, il-karkassa residwali, tessuti tal-organu mmirati u kwalunwke tessut ieħod (eż. tirojde, l-eritroċiti, l-organi ta' riproduzzjoni, il-ġidra, l-għajn (partikolarment f'annimali bix-xaħar) ta' sinifikanza potenzjali fl-evalwazzjoni tossikoloġika tal-kimika għall-ittestjar. L-analizi ta' tessuti addizzjonali fl-istess punti ta' hin għandha tiġi kkunsidrata għall-utilizzazzjoni massima tal-annimali u fil-każ li t-tossiċità tal-organu mmirat tiġi osservata fl-istudji tat-tossiċità subkronika u kronika. Il-konċentrazzjoni residwali (raju attiva) u l-proporzjonijiet ta' tessut-ghal-plażma (demmm) għandhom jiġu rreġistrati wkoll.
38. L-evalwazzjoni tad-distribuzzjoni ta' tessuti f'punti addizzjonali ta' hin bħal fil-hin ta' konċentrazzjoni massima ta' plazma/demm (eż. T_{max}) jew tar-rata massima ta' eskrezzjoni tal-awrina, miksuba mill-esperimenti rispettivi kinetici tal-plażma/demm jew ta' eskrezzjoni, tista' wkoll tkun meħtieġa jew mitluba minn awtorità kompetenti. Din l-informazzjoni tista' tkun utli biex wiehed 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 analizi ġeneralment għandhom ikunu l-istess bħal dawk ta' hawn fuq (ara l-paragrafu 37).

▼ M4

39. Il-kwantifikazzjoni tar-radjuattività għal studji dwar distribuzzjoni ta' tessuti tista' ssir billi jintużaw dissezzjoni ta' organi, omoġenizzazzjoni, kombustjoni u/jew solubilizzazzjoni, segwiti bl-ghadd 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 jingabru tessuti speċifiċi u jkunu analizzati, bħal pulmuni fi studji ta' inalazzjoni u ġilda fi studji dermali. Ara l-paragrafi 74-78.

Metabolizmu

41. Eskreta (u plażma, kif jixraq) għandhom jingabru għal identifikazzjoni u kwantifikazzjoni ta' kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti mhux mibdulini 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-tehid ta' profil ta' metaboliti minn kull perjodu ta' żmien huwa rrakkomandat. Izda, jekk nuqqas ta' kampjun u/jew radjuattività ma jhallux li jsir dan, il-ġmigh ta' awrina u rawt f'diversi punti ta' hin ikun aċċettabbli izda l-ġmigh 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 kimiki 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'kapacità għal identifikazzjoni strutturali pożittiva bħal spettrometrija tal-massa, rezonanza nukleari manjetika (NMR), eċċ. Fil-każ ta' kokromatografija, tekniki kromatografiċi li jutilizzaw l-istess fażi stazzjonarja b'żewġ sistemi differenti ta' solventi ma jtiqisux li jkunu verifika adegwata ta' żewġ metodi ta' identità ta' metaboliti, minhabba 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' pres-tazzjoni għolja (HPLC). Sakemm is-separazzjoni kromatografika tkun ta' kwalità adattata, f'dak il-każ ma tkunx mehtieġa konferma addizzjonali b'mezzi spettroskopici. 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 tinghata 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 tinghata konferma strutturali kull meta jkun possibbli. Din tista' tinkludi tehid ta' profili fil-plażma jew fid-demm jew f'tessuti oħra.

▼ M4

Eskrezzjoni

44. Ir-rata u l-kwantità ta' eskrezzjoni tad-doża amministrata għandhom ikunu ddeterminati billi jitkejjel il-perċentwali ta' doża rkuprata (radjuattività) mill-awrina, mir-rawt u mill-arja ta' teħid tan-nifs 'il barra. Din id-dejta tghin 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 jifasslu sewwa biex jithalla jkun hemm ġbir ta' dejta ta' eskrezzjoni biex jitharsu l-ghanijiet deskritti fil-paragrafu 26. Dan jippermetti li jkun hemm paragon ma' esperimenti ta' doża wahda.
45. Jekk studju pilota jkun wera li ma jkun hareġ 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 jehtigilha tingabar 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 metabolici għandhom jittalahlu b'solvent adattat (dan huwa magħruf bħala "hasil 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-rizultati 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 jissuggerux punti ta' ħin alternattivi jew addizzjonali għal ġbir. Għandu jkun ipprovdut motiv għal skedi ta' ġbir alternattivi.
49. Il-ġbir ta' CO₂ 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' Plasma/Demm*

50. Il-fini ta' dawn l-istudji huwa li jinkisbu stimi ta' parametri bażiċi ta' TK [eż. nofs hajja C_{max}, T_{max}, (t_{1/2}), AUC] għall-kimika għall-ittestjar. Dawn l-istudji jistgħu jsiru b'doża wahda 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 iklirjar (eż. biex ikun iċċarat jekk iklirjar 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 ssoġni differenzi sustanzjali fit-tossicità b'rabta mas-sessi.

▼ M4

52. Wara li tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar (b'tikketta radjologika), għandhom jinkisbu kampjuni tad-demmi minn kull annimal f'punti adatti ta' hin bl-użu ta' metodologija xierqa ta' tehid ta' kampjuni. Il-volum u l-għadd ta' kampjuni tad-demmi li jistgħu jinkisbu minn kull annimal jistgħu jkunu l-limitati minn effetti potenzjali ta' tehid ripetut ta' kampjuni fuq is-saħħa/il-fizjologija 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 jingemghu kampjuni minn aktar minn annimal wiehded. Kampjuni miġmughin għandhom ikunu identifikati b'mod ċar u għandha tinghata spjegazzjoni għall-gabra flimkien. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radjologika, analiżi tar-radjuattività totali li jkun hemm tista' tkun adegwata. Jekk ikun hekk, radjuattività totali għandha tkun analizzata fid-demmi u fil-plażma kollha jew fil-plażma u fiċ-ċelluli homor tad-demmi biex tithalla ssir kalkulazzjoni tal-proporzjon ta' demmi/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 iwwalutat it-tgħaqquq 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' hin 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 wiehded jew ripetut. Għandu jkun ipprovdut motiv dettaljat għall-approċċ użat.

54. Raġunijiet biex isiru studji oħra dwar tessuti kinetiċi jistgħu jinkludu:

- Evidenza ta' nofs haġja tad-demmi estiża, li tindika li jista' jkun hemm akkumulazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'diversi tessuti jew
- interess li wiehded 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' demmi 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' hin, u l-perkors ta' żmien ta' distribuzzjoni jkun immonitorjat f'tessuti magħżulin. Jista' jintuża sess wiehded biss, sakemm ma tkunx osservata tossiċità speċifika għall-ġeneru. Jekk ikunx 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 wiehded jew aktar li ġejjin:

1. L-evidenza li jkun hemm tkun tindika relazzjoni bejn trasformazzjoni bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar u tossiċità msahħa;
2. Id-dejta li jkun hemm dwar tossiċità tkun tindika relazzjoni mhux lineari bejn doża u metabolizmu;

▼ M4

3. Ir-riżultati ta' studji dwar identifikazzjoni ta' metaboliti juru identifikazzjoni ta' metabolite li tista' tkun tossika li setgħet kienet prodotta minn passaġġ ta' enzima miġjuba mill-kimika għall-ittestjar;
 4. Fi spjegazzjoni ta' effetti li jkun ippostulat li jkollhom rabta ma' fenomeni 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' sulfotransferazi jew glucuronosyl trasferimentazi 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 protokollu xierqa ta' studji biex tkun evalwata kimika għall-ittestjar relatata ma' bidliet f'TK, invalidati 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'tehid 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 SUPPLEMENTARI

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-metabolizmu jew l-eliminazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'ċerti speċijiet.

Użu ta' informazzjoni *in vitro*

59. Jistgħu jkunu indirizzati diversi mistoqsijiet dwar il-metabolizmu 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. Metabolizmu 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-hajja u biex ikunu kkaratterizzati parametri ta' enzimi (K_m u V_{max}) li jistgħu jkunu ta' għajjnuna fil-valutazzjoni ta' dipendenza fuq doża ta' metabolizmu b'rabta ma' livell ta' konċentrazzjoni. Flimkien ma' dan, mikrożomi jistgħu jkunu utli biex ikunu identifikati l-enzimi mikrosomali speċifiċi involuti fil-metabolizmu tal-kimika għall-ittestjar li jistgħu jkunu rilevanti f'estrapolazzjoni ta' speċijiet (ara wkoll il-paragrafu 56). Il-potenzjal għal induzzjoni ta' trasformazzjoni bijoloġika jista' wkoll ikun eżaminat billi jintużaw frazzjonijiet subċellulari tal-fwied (eż. mikrożomi u ċitosoli) tal-annimali ttrattati minn qabel bil-kimika għall-ittestjar ta' interess, *in vitro* permezz ta' studji dwar induzzjoni ta' epatoċite jew minn linji speċifiċi ta' ċelluli li jkunu jesprimu enzimi rilevanti. F'ċerti ċirkostanzi u f'kundizzjonijiet xierqa, frazzjonijiet subċellulari li jkunu ġejjin minn tessuti tal-bniedem jistgħu jitqiesu biex jintużaw biex ikunu ddeterminati differenzi li jista' jkun hemm ta' speċijiet fi trasformazzjoni bijoloġika. Ir-riżultati minn investigazzjonijiet *in vitro* jistgħu wkoll ikunu utli fl-iżvilupp ta' mudelli PBTK (5).

▼ M4

60. Studji ta' assorbiment dermali *in vitro* jistgħu jipprovdu informazzjoni supplimentari biex ikun ikkaratterizzat assorbiment (6).
61. Kulturi ta' ċelluli primarji minn ċelluli tal-fwied u f'ietti friski ta' tessuti jistgħu jintużaw biex ikunu indirizzati mistoqsijiet simili dwar mikrożomi tal-fwied. F'ċerti każijiet, jista' jkun possibbli jitlewiegħu 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 enzimi 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. Analizi ta' kampjuni ta' demm, tessuti u/jew eskreta miksubin meta jkun qed isir kull studju iehor dwar toossiċità tista' tipprovdi dejta dwar disponibbiltà bijoloġika, bidliet f'koncentrazzjoni ta' plazma f'waqtha (AUC, C_{max}), potenzjal għal akkumulazzjoni bijoloġika, rati ta' kklirjar u tibdiliet fil-ġeneru jew fi stadji tal-hajja fil-metabolizmu u fil-kinetika.
63. Konsiderazzjoni tat-tifsila tal-istudju tista' tintuża biex jitlewiegħu mistoqsijiet relatati ma': saturazzjoni ta' assorbiment, trasformazzjoni bijoloġika jew passaġġi ta' eskrezzjoni f'livelli ta' dozi oghla; it-thaddim ta' passaġġi metabolici godda f'dozi oghla u l-limitazzjoni ta' metaboliti tossiċi għal dozi oghla.
64. Konsiderazzjonijiet oħra dwar valutazzjoni tal-periklu jistgħu jinkludu kwistjonijiet bħal:

- Sensittività relatata mal-età minhabba differenzi fl-istatus tal-limitu bejn demm u moħħ, kilwa u/jew kapaċitajiet ta' diżintossifikazzjoni;
- Sensittività ta' subpopolazzjoni minhabba 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-irdiġh.

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' doza 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' dozaġġ, 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 kinetika *in vivo* għal evalwazzjoni ta' mudelli [eż. parametri ta' kklirjar għal passaġġi ta' eskrezzjoni (> 10 %), K_m u V_{max} għal metabolizmu]. 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 metabolici sikwit ikunu ddeterminati biex jiffaċilitaw żvilupp ta' mudelli mhux kompartimentali jew mudelli b'bażi fiżjoloġika (7).

▼ **M4****DEJTA U RAPPORTAR**

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-taqsimi 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 ipprezentat b'detallji suffiċjenti biex tithalla ssir evalwazzjoni tas-sejbiet.

Dahla

69. Din it-taqsimi 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-taqsimi tar-rapport għandha tinkludi deskrizzjonijiet dettaljati tal-informazzjoni kollha pertinenti, inklużi:

- (a) Kimika għall-Ittestjar

Din is-subtaqsimi 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/-kimici, 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-subtaqsimi 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 iehor użati biex tkun amministrata l-kimika għall-ittestjar.

- (b) Annimali tat-Test

Din is-subtaqsimi għandha tinkludi informazzjoni dwar l-annimali tat-test, inklużi għażla u ġustifikazzjoni għal speċi, razza u età meta jibda l-istudju, sess, kif ukoll piz tal-ġisem, stat ta' saħħa u trobbija tal-annimali.

- (c) Metodi

Din is-subtaqsimi għandha tinkludi dettalji tat-tifsila tal-istudju u l-metodoloġija użata. Għandha tinkludi deskrizzjoni ta':

- (1) Ġustifikazzjoni għal kull modifika ta' rotta ta' espożizzjoni u kundizzjonijiet ta' espożizzjoni, jekk applikabbli;

▼ **M4**

- (2) Ġustifikazzjoni għal għażla ta' livelli ta' doża;
- (3) Deskrizzjoni ta' studji pilota użati fit-tifsila sperimentali tal-istudji ta' segwitu, jekk applikabbli. Għandha tkun sottomessa dejta ta' sostenn tal-istudju pilota;
- (4) Kif tkun thejjiet 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-kejljiet 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 revizur/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 shiħa tal-mudell biex jithallew isiru rikostruzzjoni u validazzjoni indipendenti tal-mudell (ara l-paragrafu 65 u l-Appendiċi: Definizzjonijiet).

Riżultati

71. Id-dejta kollha għandha tingabar fil-qosor u tiġi ttabulata b'evalwazzjoni xierqa ta' statistika u deskritta fit-test ta' din it-taqsim. Dejta ta' radjuattività magħduda għandha tingabar 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-taqsim għandha tinkludi illustrazzjonijiet grafiċi tas-sejbiet, riproduzzjoni ta' dejta kromatografika u spettrometrika rappreżentattiva, identifikazzjoni ta' metaboliti/kwantifikazzjoni u passaġġi metabolici proposti, inkluża struttura molekulari ta' metaboliti. Flimkien ma' dan, f'din it-taqsim għandha tkun inkluża l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun tapplika:

- (1) Kwantità u perċentwali ta' rkupru ta' radjuattività fl-awrina, rawt, arja ta' tehid tan-nifs 'il barra, u hasil tal-gaġeġ mill-awrina u r-rawt.

— Għal studji dermali, inkludi wkoll dejta dwar irkupru ta' kimika għall-ittestjar minn ġilda ttrattata, minn hasil ta' ġlud u minn radjuattività residwali fl-apparat li jgħatti l-ġilda u mill-unità metabolika, u inkludi wkoll riżultati tal-istudju dwar hasil dermali. Għal aktar diskussjoni, ara l-paragrafi 74-77.

▼ **M4**

- Għal studji ta' inalazzjoni, inkludi wkoll dejta dwar irkupru ta' kimika għall-ittestjar minn pulmuni u tessuti nażali (8). Għal aktar diskussjoni, ara l-paragrafu 78.
- (2) Id-distribuzzjoni ta' tessuti tkun irrappurtata bħala perċentwali tad-doża amministrata u tal-konċentrazzjoni (ekwivalenti ta' mikrogrammi għal kull gramma ta' tessuti), u proporzjonijiet ta' tessuti ma' demm u ta' tessuti ma' plażma;
- (3) Bilanċ ta' materjali żviluppat minn kull studju li jinvolvi l-analizi ta' tessuti tal-ġisem u eskreta;
- (4) Konċentrazzjonijiet ta' plażma u parametri tossikokinetiċi (disponibbiltà bijoloġika, AUC, C_{max}, T_{max}, ikklirjar, nofs ħajja) wara amministrazzjoni mir-rotta/rotot rilevanti ta' espożizzjoni;
- (5) Rata u ammont ta' assorbiment tal-kimika għall-ittestjar wara amminis-trazzjoni mir-rotta/rotot ta' espożizzjoni;
- (6) Kwantitajiet tal-kimika għall-ittestjar u ta' metaboliti (irrapportati bħala perċentwali tad-doża amministrata) migburin fl-eskreta;
- (7) Referenza għal dejta fl-appendiċi li jkun fiha dejta dwar annimali indi-vidwalment għall-punti kollha ta' tmiem ta' kejljiet (eż. amministrazz- joni ta' doża, rkupru ta' perċentwali, konċentrazzjonijiet, parametri ta' TK, eċċ);
- (8) Figura bil-passaġġi metabolici proposti u l-istrutturi molekulari tal-meta- boliti.

Diskussjoni u Konlużjonijiet

72. F'din it-taqsimha l-awtur għandu:

- (1) Jipprovdi passaġġ metaboliku propost ibbażat fuq ir-riżultati tal-meta- bolizmu u fuq id-dispożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar;
- (2) Jiddiskuti kull speċi u differenzi sesswali potenzjali dwar id-dispożiz- zjoni 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-taqsimha kull dejta ta' TK rilevanti miksuba waqt li kienu qed isiru studji dwar tossiċità;
- (5) Jipprovdi konkluzjoni qasira li s-sejbiet tal-istudju jkunu jistgħu jsost- nuha;
- (6) Izid it-Taqsimiet (skont il-htieġa jew kif ikun jixraq).

73. Taqsimiet addizzjonali għandhom jintużaw biex tiddaħhal informazzjoni bibliografika ta' sostenn, tabelli, figuri, appendiċijiet, eċċ.

▼ M4

ROTOT ALTERNATTIVI TA' ESPOŻIZZJONI

Dermali*Trattament Dermali*

74. Din it-taqsimha tipprovdi informazzjoni speċifika dwar investigazzjoni tas-tossikokinetika tal-kimika għall-ittestjar bir-rotta dermali. Għall-assorbiment dermal, għandu jiġi kkonsutat l-kapitolu B.44 ta' dan l-Anness [Assorbiment tal-gilda: il-metodu *in vivo* (9)]. Għal punti ta' tmiem ohra bħal distribuzzjoni u metabolizmu, jista' jintuża dan il-Metodu ta' Ttestjar B.36. Għandu jintuża livell wiehed jew aktar ta' doża għall-kimika għall-ittestjar fit-trattament dermali. Il-kimika għall-ittestjar (eż. pura, dilwita jew materjal iiformulat li jkun fih il-kimika għall-ittestjar li tkun applikata fuq il-gilda) għandha tkun l-istess (jew sostitut realistiku) bħal dik li għaliha l-bnedmin jew speċi potenzjali ohra 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 dozi li fihom tkun għet osservata tossiċità fi studji ohra dermali dwar tossiċità. Id-doża dermali għandha tinħall, jekk ikun meħtieġ, f'vejjikolu adattat u tkun applikata f'volum adegwat biex iwassal id-dozi. 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, wiehed għandu joqghod attent biex jevita li jisloħ il-gilda, haġa li tista' tibdel l-permeabbiltà tagħha. Madwar 10 % tal-wiċċ tal-gisem għandu jitneħhielu kollox minn fuqu biex tkun applikata l-kimika għall-ittestjar. Għal kimiċi tossiċi hafna, l-erja tal-wiċċ koperta tista' tkun anqas minn madwar 10 %, iżda kemm jista' jkun hafna 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 ingħatat-hilhom doża għandhom jitharsu b'kopertura adattata li tinzamm ferma f'potha. L-annimali għandhom jitqieghdu f'pothom individwalment.
75. Għandu jsir studju dwar hasil dermali biex ikun ivvalutat l-ammont tad-doża applikata tal-kimika għall-ittestjar li jkun jista' jitneħha mill-gilda billi l-erja tal-gilda ttrattata tinħall b'sapun hafif 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' hasil 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 hin ta' kuntatt mal-gilda). L-ammonti ta' kimika għall-ittestjar irkuprati waqt il-hasil għandhom ikunu ddeterminati biex tkun ivvalutata l-effikaċja tat-tneħ-hija tal-kimika għall-ittestjar bil-proċedura tal-hasil.
76. Sakemm ma tkunx tista' ssir minhabba l-possibbiltà ta' korrużjoni, il-kimika għall-ittestjar għandha tkun applikata u tinzamm fuq il-gilda għal minimu ta' 6 sigħat. Meta tkun ser titneħha l-kopertura, l-erja ttrattata għandha tinħall skont il-proċedura li l-profil tagħha jinsab fl-istudju dwar il-hasil dermali (ara l-paragrafu 75). Kemm il-kopertura kif ukoll il-hasil għandhom ikunu analizzati għall-kimika għall-ittestjar residwali. Meta jintemmu l-istudji, kull annimal għandu jinqatel b'mod uman skont (2), u l-gilda ttrattata titneħha. Parti adattata mill-gilda ttrattata għandha tkun analizzata biex tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar residwali (radjuattività).
77. Għall-valutazzjoni tossikokinetika ta' farmaċewtiċi jistgħu jkunu meħtieġa proċeduri differenti, skont is-sistema regolatorja xierqa.

▼ **M4****Inalazzjoni**

78. Ghandha tintuża konċentrazzjoni wahda (jew aktar jekk ikun mehtieg) 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-immieher" jew għal "ras biss" biex ma jithalliex ikun hemm assorbiment minn rotot ta' espożizzjoni alternati (8). Jekk jintużaw kundizzjonijiet oħra ta' espożizzjoni ta' inalazzjoni, il-gustifikazzjoni għall-modifika għandha tkun iddokumentata. Idurata 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-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Il-Kapitolu B.44 ta' dan l-Anness: Assorbiment mill-Ġilda: Metodu In Vivo.
- (10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.
- (11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼ M4

Appendiċi

DEFINIZZJONIJIET

Assorbiment: Proċess(i) ta' użu ta' kimiċi fi u madwar it-tessuti. Assorbiment jirreferi għall-kompost prinċipali u l-metaboliti kollha tiegħu. Ma għandux ikun konfuż ma' "disponibbiltà bijoloġika".

Akkumulazzjoni (Akkumulazzjoni bijoloġika): Żieda fl-ammont ta' kimika għall-ittestjar tul iż-żmien f'tessuti (is-soltu tessuti xahmin, wara espożizzjoni ripetuta); jekk it-tehd ta' kimika għall-ittestjar fil-ġisem ikun akbar mir-rata li biha titneħħa, l-organizmu jakkumula l-kimika għall-ittestjar u jistgħu jseħhu konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar. Akkumulazzjoni bijoloġika:

ADME: Akronimu għal "Assorbiment, Distribuzzjoni, Metabolizmu, u Eskreta".

AUC: (Erja taht il-kurva tal-plażma ta' konċentrazzjoni-hin): Erja taht 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 hin 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-rizoluzzjoni ta' materjali radjuattivi f'tessuti. Vantaġġ wiehed sinifikanti, pereżempju, huwa li tista' tintuża f'mudell ta' annimal bix-xaġħar biex ikun ivvalutat jekk jistax ikun hemm assoċjazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ma' melanin, li jista' jgħaqqad ċerti molekuli. Izda, filwaqt li tista' tipprovdli b'mod konvenjenti prospettivi tal-ġisem kollu tas-siti ta' tghaqqid ta' kapaċità għolja u affinità baxxa, din it-teknika tista' tkun limitata biex jintgħarrfu siti mmirati speċifiċi bhal siti li jgħaqqdu reċetturi fejn ikunu meħtieġa relattivament rizoluzzjoni għolja u sensitività għolja għal detezzjoni. Meta tintuża awtoradjografija, esperimenti mahsubin 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 shah 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 tilhaq iċ-ċirkolazzjoni sistemika jew li tkun disponibbli fis-sit ta' attività fiżjoloġika. Normalment, disponibbiltà bijoloġika ta' kimika għall-ittestjar tirreferi għall-kompost prinċipali, izda 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 (jigifieri preżenza fil-ħajt tal-musrana u fiċ-ċirkolazzjoni portali) u disponibbiltà bijoloġika (jigifieri preżenza f'demm sistemiku u f'tessuti) minn degradazzjoni kimika minhabba metabolizmu fil-ħajt tal-musrana jew trasport ta' eflussura għal-lumen intestinali jew metabolizmu presistemiku fil-fwied, fost fatturi oħra (10). Disponibbiltà bijoloġika tal-komponent tossiku (kompost prinċipali jew metabolite) hija parametru kritiku fil-valutazzjoni tar-riskju 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. Izda għal kull effett minbarra fil-portal ta' dhul, hija d-disponibbiltà bijoloġika li b'mod ġenerali tkun parametru aktar affidabbli għal użu ulterjuri fil-valutazzjoni tar-riskju, mhux l-assorbiment.

▼ **M4**

Bijopersistenza: Ara “Persistenza”.

Bijotrasformazzjoni: Konverżjoni kimika (Normalment enżematika) ta’ kimika għall-ittestjar ta’ interess f’kimika differenti fil-ġisem. Sinonima ma’ “metabolizmu”.

C_{max}: Konċentrazzjoni massima (quċcata) ta’ demm (plażma/serum) wara l-amminisitrazzjoni jew eskreta massima (quċcata) (f’urina jew rawt) wara l-amminisitrazzjoni.

Rata ta’ kklirjar: Miżura kwantitattiva tar-rata li fiha kimika għall-ittestjar titnehha mid-demm, plażma jew ċerta tessut f’kull unità ta’ hin.

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-organizmu 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 titnehha kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti tagħha mill-ġisem.

B’mod esoġenu: Introdotti minn jew prodotti barra mill-organizmu jew mis-sistema.

Estrapolazzjoni: Inferenza ta’ valur wiehed jew iktar mhux magħrufin abbażi ta’ dak li huwa magħruf jew ġie osservat.

Nofs hajja (t_{1/2}): Il-hin 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: Sintezi 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-ikklijar 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-parametri 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-metabolizmu tal-kompost, zieda fl-AUC wara espożizzjoni ripetuta meta mqabbla ma’ espożizzjoni unika tista’ tkun indikattiva għall-inibizzjoni tal-metabolizmu u nuqqas fl-AUC jista’ jkun indikattiv li qed jinduċi l-metabolizmu [ara wkoll (11)].

▼ **M4**

Bilanċ tal-massa: Kontabbiltà tal-kimika għall-ittestjar li tkun diehla u hierġa mis-sistema.

Bilanċ tal-materjal: Ara “bilanċ tal-massa”.

Mekkaniżmu (Mod) ta' tossiċità/Mekkaniżmu (Mod) ta' azzjoni: Mekkanizmu 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.

Metabolizmu: Sinonima ma' “bijotrasformazzjoni”.

Metaboliti: Prodotti ta' metabolizmu jew proċessi metabolici.

Assorbiment Orali: Il-perċentwal tad-doża tal-kimika għall-ittestjar assorbita mis-sit tal-amministrazzjoni (jiġifieri sistema tal-GI). Dan il-paramteru kritiku jista' jintuża biex wiehed jifhem il-frazzjoni tal-kimika għall-ittestjar amministrata li tasal sal-vina portali, u sussegwentement 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-demem (plażma/serum): Konċentrazzjoni massima (quċċata) tad-demem (plażma/serum)wara l-amministrazzjoni (ara wkoll “ C_{max} ”).

Persistenza (persistenza bijoloġika): Preżenza fit-tul ta' kimika (f'sistema bijoloġika) minhabba rezistenza għal degradazzjoni/eliminazzjoni.

Aqra min-naħa għall-ohra: 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-riċevitur jew mod speċifiku ta' studji ta' azzjoni li jistgħu jirrikjedu riżoluzzjoni għolja u sensitività għolja li tista' ma tkunx fattibbli ma' tekniki ohra bħall-awtoradjografija tal-ġisem kollu.

Rotta ta' amministrazzjoni (orali, IV, dermal, inalazzjoni, eċċ.): Tirreferi għall-mezzi li bihom kimiċi jkunu amministrati lill-ġisem (eż. mill-halq b'gavage, mill-halq b'dieta, mill-gilda, man-nifs 'il ġewwa, mill-vina, eċċ).

Saturazzjoni: Stat li bih wiehed jew aktar mill-proċessi kinetiċi (eż. assorbiment, metabolizmu 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-demem (plażma): L-istat mhux ekwilibrat ta' sistema miftuħa li fiha l-forzi kollha li jaġixxu fuq is-sistema huma eżattament kontro-bilanċjati minn forzi ta' oppożizzjoni, f'tali manjiera li l-komponenti kollha tagħha huma stazzjonarji fil-konċentrazzjoni għalkemm fis-sistema hemm fluss ta' materjal.

Mudellar ta' Sistemi (Tossikokinetiċi bbażati fuq il-Fiżjoloġija, ibbażati fuq il-Farmakokinetika, Farmakokinetiċi bbażati fuq il-Fiżjoloġija, ibbażati fuq il-Bijoloġija, eċċ.): Mudell astratt li juża lingwa matematika biex jiddeskrivi l-aġir tas-sistema.

Tessut immirat: Tessut li fih ikun jidher effett prinċipali avvers ta' sustanza tossika.

▼ **M4**

Kimika għall-ittestjar: Kwalunkwe kimika jew tahlita ttestjati bl-użu ta' dan il-Metodu għall-Ittestjar.

Distribuzzjoni tat-Tessuti: Ċaqliq riversibbli ta' kimika għall-ittestjar minn post fil-ġisem għall-post ieħor. Id-distribuzzjoni tat-tessut tista' tiġi studjata mid-dissezzjoni ta' organu, l-omoġenizzazzjoni, il-kombustjoni u l-ghadd 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-ahħar hawn fuq.

T_{max}: Hin biex jintlahaq C_{max}.

Tossikokinetiċi (Farmakokinetiċi): Studju tal-assorbiment, distribuzzjoni, metabolizmu, 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. hin). Kemm tkun l-evalwazzjoni għandu jkun iġġustifikat b'rabta mal-użu mahsub tal-mudell.



B.37. ID-DEWMIEN FIN-NEWROTOSSIČITÀ TAS-SUSTANZI ORGANOPHOSPHORUS WARA L-ESPOŻIZZJONI AKUTA

1. METODU

1.1. INTRODUZZJONI

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' l-effetti tossiċi tas-sustanzi, huwa importanti li jiġi ikkonsidrat il-potenzjal ta' ċerti klassijiet ta' sustanzi biex jikkawża tipi speċifiċi ta' newrotossicità li jistgħu ma jidrx fi studji tossiċi oħra. Ċerti sustanzi *organophosphorus* jidru li jikkawżaw dewmien tan-newrotossicità u għandhom jitqisu kandidati għall-evalwazzjoni.

Testijiet ta' *screening in vitro* jistgħu jithaddmu biex jidentifikaw dawk is-sustanzi, jistgħu jikkawżaw dewmien fil-*polyneuropathy*; madankollu, sejbiet negattivi fl-istudji *in vitro* ma jipprovdux evidenza li s-sustanza tat-test mhix *newrotossikant*.

Ara l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanzi *organophosphorus* jinkludu l- *organophosphorus esters*, *it-thioesters uncharged* jew *l-anhydrides* ta' l-aċdi *organophosphoric*, *organophosphonic* jew *organophosphoramidic* jew ta' l-aċdi *phosphorothioic*, *phosphonothioic* jew *phosphorothioamidic relati*, jew sustanzi oħra li jistgħu jikkawżaw dewmien ta' newrotossicità li xi drabi tidher f'din il-klassi ta' sustanzi.

Id-dewmien tan-newrotossicità huwa sindromu assoċjat ma' *l-onset* tad-dewmien prolunġat ta' *l-ataxia*, *id-distal axonopathies* fil-korda spinali u n-nerv periferali, u l-inibizzjoni u x-xjuħija tan-*neuropathy target esterase (NTE)* fit-tessut newrali.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanza ta' referenza tista' tiġi ttestjata bi grupp ta' kontroll pozittiv li juri li taħt il-kundizzjonijiet tat-test tal-laboratorju, irrispons ta' l-ispeċi ittestjati ma nbidilx b'mod sinifikanti.

Eżempju ta' newrotossikant użat f'irxa wisgħa huwa il-fosfat *tri-o-tolyl phosphate* (*Cas 78-30-8*, *Einecs 201-103-5*, *Cas* nomenkultura: l-aċdu fosforiku, *tris(2-methylphenyl)ester*), magħruf ukoll bħala *tris-o-cresylphosphate*.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test tiġi somministrata oralment lit-tiġieġ domestiku f'doza waħda. Meta huwa xieraq, it-tiġieġ huwa mħares mill-effetti *cholinergic* akuti. L-annimali jiġu osservati għal 21 jum għal imġieba anormali, *ataxia* u paralizi. Il-kejl bijokemikali, b'mod partikolari l-inibizzjoni tan-*neuropathy target esterase (NTE)*, isir fuq it-tiġieġ li jingħażel bl-addoċċ minn kull grupp. Dan normalment isir 24 u 48 siegħa wara d-dożaġġ. Wiehed u għoxrin jum wara l-espożizzjoni l-bqija tat-tiġieġ jiġi maqtul u ssir l-eżaminazzjoni hispatoloġika ta' tessuti newrali magħżula.

▼B**1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST****1.5.1. Thejjija**

Tiġieġ b'saħħtu u adult zagħżuġ li huwa hieles minn mard virali u l-medikazzjoni li jfixxklu u li m'għandux anormalitajiet fil-mixja għandu jingħažel bl-adoċċ u assenjati għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament. Għandu wkoll jadatta għall kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 jiem qabel il-bidu ta' l-istudju.

Gaġeġ jew spazji magħluqa li huma kbar bizzejjed biex jippermettu ċ-ċaqliq hieles tat-tiġieġ, u għandu jkun faċli biex tiġi osservata l-mixja tiegħu.

Id-dożaġġ bis-sustanza tat-test għandha normalment tingħata oralment bl-ghalf li jingħata bilfors, kapsuli tal-ġelatina, jew metodu li jitqabbel magħhom. Il-likwidi jistgħu jingħataw mhux imħallta bl-ilma jew mahlula f'mezz xieraq bħal ma huwa ż-żejt tal-qamħ; jekk hu possibbli s-solidi għandhom jinħallu la darba dozi kbar tas-solidi fil-kapsuli tal-ġelatina jistgħu ma jiġux assorbiti sew. Għall-mezzi li mhumiex akwei il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa, u jekk le għandhom jiġu determinati qabel it-test.

1.5.2. Kundizzjonijiet tat-test**1.5.2.1. *Animali għat test***

It-tiġieġ zagħżuġ adult domestiku u li jbid (*Gallus gallus domesticus*), li għandu minn 8 sa 12-il xahar huwa rakkomandat. Għandhom jintużaw daqsijiet u razez standard. Normalment it-tiġieġ għandu jitrabba f'kundizzjonijiet li jippermettu ċ-ċaqliq hieles.

1.5.2.2. *In-numru u s-sess*

Barra l-grupp tat-trattament, għandhom jintużaw kemm il-grupp ta' mezz ta' kontroll u kemm dak ta' kontroll pozittiv. Il-grupp tal-mezz ta' kontroll għandu jiġi trattat bl-istess mod tal-grupp għat-trattament, hlief li s-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test titneħħa.

Għandu jintużaw numru bizzejjed ta' tiġieġ f'kull grupp ta' għasafar sabiex mill-inqas sitt għasafar jistgħu jinqatlu għad-determinazzjoni bijokemikali (tlieta f'kull żewġ punti) u sitta jistgħu jibqgħu jgħixu tul il-perjodu ta' osservazzjoni għall-patoloġija ta' 21 jum.

Il-grupp ta' kontroll pozittiv jista' jsehh fl-istess hin jew ikun grupp ta' kontroll riċenti storiku. Għandu mill-inqas ikollu sitt tiġieġiet, trattati b'newrotossikant b'dewmien magħruf, tliet tiġieġiet għall-bijokemistrija u tliet tiġieġiet għall-patoloġija. Huwa rakkomandat laġġornament perjodiku tad-data storika. Data ġdida ta' kontroll pozittiv għandha tiġi żviluppata meta xi element essenzjali (eż. ir-razza, l-ghalf u l-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew) ta kif isir it-test jinbidel mil-laboratorju attiv.

▼B

1.5.2.3. *Il-livelli tad-doża*

Għandu jsir studju preliminary bl-użu ta' numru xieraq ta' tiġieġ u ta' gruppi ta' livelli tad-doża sabiex jiġi stabbilit il-livell li se jintuża fl-istudju prinċipali. Il-mewt hija tipikament mehtieġa f'dan l-istudju preliminarj sabiex tiġi stabbilita doża adegwata ta' l-istudju prinċipali. Madankollu, sabiex tiġi evitata il-mewt minhabba l-effetti *cholinergic* akuti, jista' jintuża *l-atropine* jew aġent protettiv ieħor magħruf li ma jfixkilx ir-rispons tad-dewmien fin-newrotossicità. Varjetà ta' metodi għat-test jistgħu jintużaw biex tiġi kkalkulata d-doża massima mhux letali tas-sustanzi għat-test (Ara l-metodu B.1bis). Id-data storika fit-tiġieġa jew informazzjoni tossikoloġika ohra tista' tkun ta' għajjnuna fl-għażla tad-doża.

Il-livell tad-doża tas-sustanza għat-test fl-istudju prinċipali għandu jkun għoli kemm jista' jkun waqt li jitqiesu ir-riżultati ta' l-istudju preliminarj għall-għażla tad-doża u l-limitu fuqani tad-doża tal-piż tal-ġisem ta' 2 000 mg/kg. F'21 jum, kwalunkwe mortalità li tista' ssehh m'għandhiex tfixkel is-sopravivenza ta' biżżejjed annimali għall-bijokemistrija (sitta) u għall-istoloġija (sitta). *L-atropine* jew aġent protettiv ieħor, magħruf li ma jfixkilx ir-rispons tad-dewmien fin-newrotossicità, għandu jintuża sabiex tiġi evitata l-mewt minhabba effetti *cholinergic* akuti.

1.5.2.4. *It-test tal-limitu*

Jekk test f'livell wiehed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 2 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/gurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati) u jekk it-tossicità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx mehtieġ. It-test tal-limitu japplika hlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-htieġa li jiġi użat livell oghla ta' doża.

1.5.3. **Il-perjodu ta' l-Osservazzjoni**

Il-perjodu ta' osservazzjoni għandu jkun ta' 21 jum.

1.5.4. **Il-proċedura**

Wara s-somministrazzjoni ta' aġent protettiv sabiex jevita l-mewt minhabba l-effett *cholinergic* akut, is-sustanza għat-test tiġi somministrata f'doża wahda.

Osservazzjoni ġenerali

L-Osservazzjonijiet għandhom jibdwu mill-ewwel wara l-espożizzjoni. It-tiġieġ kollu għandu jiġi osservat bosta drabi waqt l-ewwel jumejn imbagħad mill-inqas darba kuljum għall-perjodu ta' 21 jum jew sal-qtil skedat. Għandhom jiġu rrekordjati s-sinjali kollha tat-tossicità, inklużi l-hin ta' l-onset, it-tip, il-qawwa u d-dewmien ta' l-anormalitajiet fl-imġiba. *L-ataxia* għandha titkejjel fuq skala ordinali ta' gradazzjoni li tikkonsisti f'erba' livelli u l-paralizi għandha tiġi nnutata. Mill-inqas darbtejn fil-ġimgħa t-tiġieġ magħżul għall-patoloġija għandu jinhareġ mill-gaġeġ u jiġi suġett għal perjodu ta' attività *forced motor*, bħal ngħidu ahna t-tluġh mas-sellun, sabiex tiġi faċilitata l-osservazzjoni ta' l-effetti tossiċi minimali. L-annimali li qed imutu u daww fi tblattija jew uġiġh għandhom jitnehhew, jinqatlu b'mod uman u sottomessi għan-nekropsija.

▼B

Il-piż tal-gisem

It-tigieġ kollu għandu jintizen eżatt qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u mill-inqas darba fil-ġimgha wara dan.

Bijokemistrija

Sitt tiġigiet jingħażlu bl-adoċ minn kull grupp tal-mezz ta' kontroll u ta' trattament, u tliet tiġigiet mill-grupp ta' kontroll pożittiv (meta dan il-grupp isehh fl-istess żmien), għandhom jinqatlu fi żmien ftit jiem wara d-dożaġġ. Il-mohh u l-korda spinali lumbar jiġu mhejjija u analizzati għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-neuropath target esterase. Barra minn hekk, itthejjija u l-analizi tat-tessut tan-nerv xjatiku jistgħu jkunu ta' għajjnuna għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-neuropath target esterase. Normalment, tlett għasafar tal-grupp ta' kontroll u ta' kull trattament jinqatlu wara 24 siegħa u tlieta jinqatlu wara 48 siegħa. It-tlett tiġigiet tal-kontrolli pożittivi għandhom jinqatlu f'24 siegħa. Jekk l-osservazzjoni ta' sinjali kliniċi ta' intossikazzjoni (dan jista' jiġi evalwat permezz ta' l-osservazzjoni tal-hin ta' *l-onset* tas-sinjali *cholinergic*) juru li l-aġent tossiku jista' jitwarrab bil-mod allura huwa preferibbli li jittiehed kampjun tat-tessut għal darbtejn minn kull wiehed mit-tlett għasafar bejn 24 sa 72 siegħa wara d-dożaġġ.

L-analizi ta' l-acetylcholinesterase (AChE) tista' ssir ukoll fuq dawn il-kampjuni jekk ikun xieraq. Madankollu, ir-reattivazzjoni spontanja ta' l-AChE tista' ssehh *in vivo*, u b'hekk twassal għal nuqqas ta' valutazzjoni dwar l-effikaċja tas-sustanza bħala inibitur AChE.

Nekropsija Grossa

In-nekropsija grossa ta' l-annimali kollha (skedati li jinqatlu u jinqatlu meta jkunu moribondi) għandha tinkludi l-osservazzjoni tad-dehra tal-mohh u tal-korda spinali.

L-eżaminazzjoni Ispatologika

It-tessut newrali mill-annimali li jibqgħu hajjin fil-perjodu ta' l-osservazzjoni u li ma jintużawx għal studji bijokemikali għandhom ikunu suġġetti għall-eżaminazzjoni mikroskopika. It-tessuti għandhom jiġu ffixati *in situ*, bl-użu ta' tekniki ta' perfużjoni. Is-sezzjonijiet għandhom jinkludu ċ-ċerebellum (il-livell mid-longitudinali), il-*medulla oblongata*, il-korda spinali, u n-nervituri periferali. Is-sezzjonijiet tal-korda spinali għandhom jittiehdu mill-parti ċervikali ta' fuq, miż-żoni *mid-thoracic* u *lumbo-sacral*. Għandhom jittiehdu sezzjonijiet miż-żona *distal* tan-nerv tibjali u l-friegħi tiegħu sal-muskolu *gastrocnemial* u tan-nerv xjatiku. Is-sezzjonijiet għandhom jittebbgħu bi tbajja speċifiċi xierqa ta' *myelin* u ta' *l-axon*.

2.

DATA

Normalment ir-riżultati negattivi fuq *l-endpoints* magħżula f'dan il-metodu (l-osservazzjoni tal-bijokemistrija, ta' l-ispatologija u ta' l-imġiba) ma jitolbux iktar ittestjar għad-dewmien tan-newrotossicità. Riżultati żbaljati jew inkonklussivi għal dawn *l-endpoints* jistgħu jitolbu evalwazzjoni addizzjonali.

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun imqassra f'għamla tabulari, li turi n-numru ta' l-annimali għal kull grupp tat-test fil-bidu tiegħu, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, l-effetti ta' l-imġiba jew dawk bijokemikali, it-tip u l-gravità ta' dawn il-feriti jew effetti, u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip u gravità tal-feriti jew ta' l-effett.

▼B

Is-sejbiet ta' dan l-istudju għandhom jiġu elvawati f'termini ta' l-inċidenza, tal-gravità, u tal-korrelazzjoni tal-effetti ta' l-imġiba, ta' dawk bijokemikali u dawk ispatoloġiċi u kwalunkwe effetti oħra osservati fil-gruppi ta' kontroll u dawk trattati.

Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati permezz ta' metodi ta' statistika xierqa u ġeneralment aċċettabbli. Il-metodi ta' statistika użati għandhom jiġu magħzula waqt id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

IR-RAPPORTTAT-TEST

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

3.1. **Animali għat-test**

- l-ispeċi użati;
- in-numru u l-età ta' l-animali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, eċċ.;
- il-piżijiet individwali ta' l-animali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

- id-dettalji tat-thejija tas-sustanza għat-test, l-istabilità u l-omogeneità fejn hu xieraq;
- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;
- id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;
- id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma;
- Ir-rationale għall-għażla tad-doża;
- L-ispeċifikazzjoni tad-doži somministrati, inklużi d-dettalji tal-mezz, tal-volum u tal-forma fiżika tal-materjal somministrat;
- L-identità u d-dettalji tas-somministrazzjoni ta' kwalunkwe aġent protettiv.

Riżultati:

- id-data tal-piż tal-ġisem;
- id-data tar-ripons tossiku fi grupp, inkluża l-mortalità;
- in-natura, l-gravità u d-dewmien taż-żmien ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (kemm jekk huma reversibbli jew le);
- deskrizzjoni dettaljata tal-metodi u s-sejbiet bijokemikali;
- is-sejbiet tan-nekropsija;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha ispatoloġiċi;
- fejn hu xieraq, it-trattament statistiku tar-riżultati.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konklużjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analoġu għal OECD TG 418.

▼B

B.38. **ID-DEWMEN FIN-NEWROTOSSICITÀ TAS-SUSTANZI
ORGANOPHOSPHORUS STUDJU TA' DOŻA RIPETUTTA
GHAL 28 ĠURNATA**

1. **METODU**

1.1. **INTRODUZZJONI**

Fil-valutazzjoni u fl-evalwazzjoni ta' l-effetti tossiċi tas-sustanzi, huwa importanti li jiġi ikkonsidrat il-potenzjal ta' ċerti klassijiet ta' sustanzi biex jikkawża tipi speċifiċi ta' newrotossicità li jistgħu ma jidrx fi studji tossiċi oħra. Ċerti sustanzi organophosphorus jidru li jikkawżaw dewmien tan-newrotossicità u għandhom jitqisu kandidati għall-evalwazzjoni.

Testijiet ta' *screening in vitro* jistgħu jithaddmu biex jidentifikaw dawk is-sustanzi jistgħu jikkawżaw dewmien fil-*polyneuropathy*; madankollu, sejbiet negattivi fl-istudji *in vitro* ma jipprovdux evidenza li s-sustanza tat-test mhiex newrotossikant.

Dan it-test ta' 28 jum tad-dewmien tan-newrotossicità jipprovdi l-informazzjoni fuq il-perikli għas-saħħa possibbli li jista' jkun hemm minhabba espożizzjonijiet repetuti f'perjodu limitat ta' żmien. Jipprovdi informazzjoni fuq ir-rispons tad-doża u jista' jipprovdi kalkolu ta' *no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati), li jista' jkun utli sabiex jiġu stabbiliti l-kriterji ta' sigurtà għall-espożizzjoni.

Ara wkoll l-Introduzzjoni Ġenerali Parti B

1.2. **DEFINIZZJONIJIET**

Is-sustanzi *organophosphorus* jinkludu l- *organophosphorus esters*, *it-thioesters uncharged* jew *l-anhydrides* ta' l-aċidi *organophosphoric*, *organophosphonic* jew *organophosphoramidic* jew ta' l-aċidi *phosphorothioic*, *phosphonothioic* jew *phosphorothioamidic* relatati, jew sustanzi oħra li jistgħu jikkawżaw dewmien ta' newrotossicità li xi drabi tidher f'din il-klassi ta' sustanzi.

Id-dewmien tan-newrotossicità huwa sindromu assoċjat ma' l-onset tad-dewmien prolongat ta' l-ataxia, id-distal axonopathies fil-korda spinali u n-nerv periferali, u l-inibizzjoni u x-xjuħija tan-*neuropathy target esterase (NTE)* fit-tessut newrali.

1.3. **IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST**

Id-doži ta' kuljum tas-sustanza għat-test huma somministrati oralment lit-tiġieġ domestiku għal 28 jum. L-annimali jiġu osservati għallinqas kuljum għal anormalitajiet fl-imġiba, għall-*ataxia* u għall-paraliżi sa 14-il jum wara l-aħħar doża. Il-kejl bijokemikali, b'mod partikolari l-inibizzjoni *tan-neuropathy target esterase (NTE)*, isir fuq it-tiġieġ li jingħażel bl-addoċ minn kull grupp. Dan normalment isir 24 u 48 siegħa wara d-dożaġġ. Hmistax wara l-aħħar doża il-bqija tat-tiġieġ jiġi maqtul u ssir eżaminazzjoni ispatoloġika tat-tessuti newrali magħżula.

▼B

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

Tigieġ b'saħħtu u adult zagħżuġ li huwa hieles minn mard virali u l-medikazzjoni li jfixxklu u li m'għandux anormalitajiet fil-mixja għandu jingħażel bl-adoċċ u assenjati għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament. Għandu wkoll jadatta għall kundizzjonijiet tal-laboratorju għal mill-inqas 5 jiem qabel il-bidu ta' l-istudju.

Gaġeġ jew spazji magħluqa li huma kbar bizżejjed biex jippermettu ċ-ċaqliq hieles tat-tigieġ, u għandu jkun faċli biex tiġi osservata l-mixja tiegħu.

Id-dożaġġ orali kuljum, 7 ijiem fil-gimgha, għandu jitwettaq preferibbilment permezz ta' l-għalf mogħti bil-fors jew bis-sommistrazzjoni tal-kapsuli tal-gelatina. Il-likwidi jistgħu jingħataw mhux imħallta bl-ilma jew mahlula f'mezz xieraq bħal ma huwa ż-żejt tal-qamħ; jekk hu possibbli s-solidi għandhom jinħallu la darba dożi kbar tas-solidi fil-kapsuli tal-gelatina jistgħu ma jiġux assorbiti sew. Għall-mezzi li mhumx akwei il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz iridu jkunu magħrufa, u jekk le għandhom jiġu determinati qabel it-test.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test***Animali għat-test*

It-tigieġ zagħżuġ adult domestiku u li jbid (*Gallus gallus domesticus*), li għandu minn 8 sa 12-il xahar huwa rakkomandat. Għandhom jintużaw daqsijiet u razez standard. Normalment it-tigieġ għandu jitrabba f'kundizzjonijiet li jippermettu ċ-ċaqliq hieles.

In-numru u s-sess

Ġeneralment għandhom jintużaw mill-inqas tlett gruppi ta' trattament u grupp ta' kontroll tal-mezz. Il-grupp ta' kontroll tal-mezz għandu jiġi trattat bl-istess mod bħal dak ta' trattament hliel li s-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test hija mneħħija.

Għandu jintużaw numru bizżejjed ta' tigieġ f'kull grupp ta' għasafar sabiex mill-inqas sitt għasafar jistgħu jinqatlu għad-determinazzjoni bijokemikali (tlieta f'kull żewġ punti) u sitt għasafar jistgħu jgħixu waqt l-14-il jum tal-perjodu ta' osservazzjoni wara t-trattament għall-patoloġija.

Livelli tad-doża

Il-livelli tad-doża għandhom jingħazlu waqt li jitqiesu r-riżultati tat-test akut fuq id-dewmien tan-newrotossicità u kwalunkwe tossicità oħra li teżisti jew id-data kinetika disponibbli għall-*compound* tat-test. L-ogħla livell tad-doża għandu jingħażel bl-għan li jkun hemm żieda ta' effetti tossiċi, preferibbilment tan-newrotossicità b'dewmien, iżda mhux ta' mewt jew tbatija ovvja. Wara, sekwenza niezla tal-livelli tad-doża għandha tingħażel bl-għan li jidher kwalunkwe rispons relatat mad-doża u *no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati), fl-iktar livell ta' doża baxx.

▼ B*Test ta' limitazzjoni*

Jekk test f'livell wiehed ta' doża ekwivalenti għal mill-inqas 1 000mg/kg tal-piż tal-ġisem/gurnata, bl-użu tal-proċeduri deskritti għal dan l-istudju, jipproduċi in-*no-observed-adverse-effects* (l-ebda effetti avversi osservati) u jekk it-tossiċità ma tkunx mistennija bbażata fuq id-data minn sustanzi strutturalment relatati, allura studju komplut bl-użu ta' tliet livelli ta' doża ma jkunx mehtieg. It-test tal-limitu japplika hlief meta l-espożizzjoni umana tindika il-htieġa li jiġi użat livell oghla ta' doża.

Perjodu ta' l-Osservazzjoni

L-annimali kollha għandhom jiġu osservati mill-inqas kuljum waqt il-perjodu ta' l-espożizzjoni u 14-il jum wara, sakemm ma jkunx hemm nekropsija skedata.

1.4.3. **Proċedura**

Animals are dosed with the test substance on seven days per week for a period of 28 days.

Osservazzjoni ġenerali

L-osservazzjonijiet għandhom jibdew mill-ewwel wara li jibda t-trattament. It-tiġieġ kollu għandu jiġi osservat mill-inqas darba kuljum f'kull wiehed mit-28 jum ta' trattament, u għal 14-il jum wara d-dożaġġ jew sal-qtil skedat. Għandhom jiġu rrekordjati is-sinjali kollha ta' tossiċità inklużi il-hin ta' l-onset tagħhom, it-tip, il-gravità u d-dewmien ta' żmien. L-osservazzjonijiet għandhom jinkludu, izda mhux limitati għal, l-anormalitajiet ta' fl-imġiba. L-*ataxia* għandha titkejjel fuq skala ordinali ta' gradazzjoni li tikkonsisti f'erba' livelli, u għandha tiġi nnutata l-paralizi. Mill-inqas darbtejn fil-ġimgħa it-tiġieġ għandu jittiehed barra l-gaġeġ u suġġett għal perjodu ta' attività *forced motor*, bħal nġhidu ahna t-tluġh mas-sellum, sabiex tiġi faċilitata l-osservazzjoni ta' l-effetti tossiċi minimali. L-annimali moribondi li qed ibatu hafna jew li huma muġugħa għandhom jitnehhew, jinqatlu b'mod uman u sottoposti għan-nekropsija.

Il-piż tal-ġisem

It-tiġieġ kollu għandu jintizen eżatt qabel is-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test u mill-inqas darba fil-ġimgħa wara dan.

Bijokemistrija

Sitt tiġieġiet magħżula bl-addoċ minn kull grupp ta' trattament u ta' kontroll tal-mezz, għandhom jinqatlu fi ftit jem wara l-aħħar doża. Il-mohħ u l-korda spinali *lumbar* jiġu mhejjija u analizzati għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-*neuropath target esterase (NTE)*. Barra minn hekk, it-thejjija u l-analizi tat-tessut tan-nerv xjatiku jistgħu jkun ta' għajnuna għall-attività ta' l-inibizzjoni tan-*neuropath target esterase (NTE)*. Normalment, tlett għasafar tal-grupp ta' kontroll u ta' kull trattament jinqatlu wara 24 siegħa u tlieta jinqatlu wara 48 siegħa wara l-aħħar doża. Jekk id-data mill-istudju akut jew studju iehor (eż. it-tossikokinetiċi) turi li hinijiet oħra tal-qtil wara d-dożaġġ finali huma preferibbli, mela għandhom jintużaw dawn il-hinijiet u r-*rationale* tiġi dokumentata.

L-analizi ta' l-acetylcholinesterase (AChE) tista' ssir ukoll fuq dawn il-kampjuni jekk ikun xieraq. Madankollu, ir-reattivazzjoni spontanja ta' l-AChE tista' ssehh *in vivo*, u b'hekk twassal għal nuqqas ta' valutazzjoni dwar l-effikaċja tas-sustanza bħala inibitur AChE.

▼B

Nekropsija Grossa

In-nekropsija grossa ta' l-annimali kollha (skedati li jinqatlu u jinqatlu meta jkunu moribondi) għandha tinkludi l-osservazzjoni tad-dehra tal-moħħ u tal-korda spinali.

L-eżaminazzjoni Ispatologika

It-tessut newrali mill-annimali li jibqgħu hajjin fil-perjodu ta' l-osservazzjoni u li ma jintużawx għal studji bijokemikali għandhom ikunu suġġetti għall-eżaminazzjoni mikroskopika. It-tessuti għandhom jiġu ffissati *in situ*, bl-użu ta' tekniki ta' perfużjoni. Is-sezzjonijiet għandhom jinkludu ċ-ċerebellum (il-livell mid-longitudinali), il-*medulla oblongata*, il-korda spinali, u n-nervituri periferali. Is-sezzjonijiet tal-korda spinali għandhom jittiehdu mill-parti ċervikali ta' fuq, miż-żoni *mid-thoracic* u *lumbo-sacral*. Għandhom jittiehdu sezzjonijiet miż-żona *distal* tan-nerv tibjali u l-friegħi tiegħu sal-muskolu *gastrocnemial* u tan-nerv xjatiċu. Is-sezzjonijiet għandhom jittebbgħu bi tbajja speċifiċi xierqa ta' *myelin* u ta' *l-axon*. Fil-bidu l-eżaminazzjoni mikroskopika għandha titwettag fuq it-tessuti priservati tal-annimali kollha fil-grupp ta' kontroll u f'dak ta' doża għolja. Fejn hemm evidenza ta' l-effetti fil-grupp ta' doża għolja, l-eżaminazzjoni mikroskopika għandha titwettag ukoll fuq it-tiġieġ li qedgħin fil-gruppi ta' doża intermedjarja u baxxa.

2. DATA

Normalment ir-riżultati negattivi fuq l-*endpoints* magħzula f'dan il-metodu (l-osservazzjoni tal-bijokemistria, ta' l-ispatologija u ta' l-imġiba) ma jitolbux iktar ittestjar għad-dewmien tan-newrotossici. Riżultati żbaljati jew inkonklussivi għal dawn l-*endpoints* jistgħu jitolbu evalwazzjoni addizzjonali.

Id-data individwali għandha tiġi provduta. Barra minn hekk, id-data kollha għandha tkun imqassra f'għamla tabulari, li turi n-numru ta' l-annimali għal kull grupp tat-test fil-bidu tiegħu, in-numru ta' l-annimali li għandhom il-feriti, l-effetti ta' l-imġiba jew dawk bijokemikali, it-tip u l-gravità ta' dawn il-feriti jew effetti, u l-perċentwal ta' l-annimali li għandhom kull tip u gravità tal-feriti jew ta' l-effett.

Is-sejbiet ta' dan l-istudju għandhom jiġu elvawati f'termini ta' l-inċidenza, tal-gravità, u tal-korrelazzjoni tal-effetti ta' l-imġiba, ta' dawk bijokemikali u dawk ispatologiċi u kwalunkwe effetti oħra osservati fil-gruppi ta' kontroll u dawk trattati.

Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu evalwati permezz ta' metodi ta' statistika xierqa u ġeneralment aċċettabbli. Il-metodi ta' statistika użati għandhom jiġu magħzula waqt id-disinn ta' l-istudju.

3. RAPPORTAĠĠ

IR-RAPPORT TAT-TEST

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

3.1. Annimali għat-test

- l-ispeċi użati;
- in-numru u l-età ta' l-annimali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet ta' fejn jitpoġġew, eċċ,;
- il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

▼B

3.2. Kundizzjonijiet tat-test:

- id-dettalji tat-thejjija tas-sustanza għat-test, l-istabilità u l-omogeneità fejn hu xieraq;
- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-mezz;
- id-dettalji tas-somministrazzjoni tas-sustanza għat-test;
- id-dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u ta' l-ilma;
- *Ir-rationale* għall-għażla tad-doża;
- L-ispeċifikazzjoni tad-dożi somministrati, inklużi d-dettalji tal-mezz, tal-volum u tal-forma fiżika tal-materjal somministrat;
- *Ir-rationale* għall-għażla ta' hinijiet oħra għad-determinazzjoni bijokemikali jekk mhux 24 u 48 siegħa.

3.3. Riżultati:

- id-data tal-piż tal-ġisem;
- id-data ta r-rispons tossiku permezz tal-livell tad-doża, inkluża l-mortalità;
- l-ebda livell ta' effett avvers osservat;
- in-natura, l-gravità u d-dewmien taż-żmien ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (kemm jekk huma reversibbli jew le);
- deskrizzjoni dettaljata tal-metodi u s-sejbiet bijokemikali;
- is-sejbiet tan-nekropsija;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha ispatoloġiċi;
- fejn hu xieraq, it-trattament statistiku tar-riżultati.

Id-diskussjoni tar-riżultati

Konkluzjonijiet.

4. **REFERENZI**

Dan il-metodu huwa analoġu għal OECD TG 419.

▼B

B.39. TEST *IN VIVO* TA' SINTESI MHUX PROGRAMMATA TA' DNA (UDS) FUQ ĊELLULI TAL-FWIED TAL-MAMMIFERI

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika tat-Test OECD TG 486 *In vivo* ta' Sintesi Mhux Programmata ta' DNA (UDS) fuq Ċelloli tal-Fwied tal-Mammiferi (1997).

1.1. INTRODUZZJONI

L-ghan tat-test *in vivo* ta' sintesi mhux programmata ta' DNA (UDS) fuq Ċelloli tal-fwied tal-mammiferi huwa biex jiġu identifikati sustanzi tat-test li johlqu t-tiswija tad-DNA f'Ċelloli tal-fwied ta' annimali ttrattati (1), (2), (3), (4).

Dan it-test *in vivo* jipprovdi metodu għall-investigazzjoni ta' l-effetti ġenotossici ta' kimiċi fil-fwied. Il-punt ta' l-aħhar imkejjet jagħti indikazzjoni tal-hsara fid-DNA u t-tiswija sussegwenti fiċ-Ċelloli tal-fwied. Il-fwied generalment huwa l-lok magħguri tal-metabolismu ta' komposti assorbiti. Għalhekk huwa l-lok xieraq biex titkejjel il-hsara fid-DNA *in vivo*.

Jekk ikun hemm prova li s-sustanza tat-test mhix ser tilhaq it-tessut immirat, mhuwiex xieraq li jintuza dan it-test.

L-aħhar punt ta' sintesi DNA (UDS) mhux programmata jitkejjel billi jiġi stabbilit l-assorbiment ta' nukleosidi mmarkati f'Ċelloli li ma jkunux għaddejin minn sintesi tad-DNA programmata (fasi S). Il-metodu ta' teknika l-aktar użat huwa d-determinazzjoni ta' l-assorbiment ta' tritium thymidine immarkat (3H-TdR) bl-awtoradjografija. Preferibbilment jintużaw il-fwied tal-far għat-testijiet *in vivo*. Jistgħu jintużaw tessuti oħra minklok il-fwied, iżda mhumix is-sugġett ta' dan il-metodu.

L-iżvelar ta' rispons UDS jiddependi fuq in-numru ta' bażi DNA exxissi u mibdula fuq il-lok tal-hsara. Għalhekk, it-test UDS huwa partikolarment ta' valur biex tiġi żvelata r-riparazzjoni ta' segwenzi twal li jiġu mis-sustanza (20 sa 30 bażijiet). Bħala kuntrast, ir-riparazzjoni ta' segwenzi qosra (minn bażi waħda sa tlieta) tiġi żvelata b'sensittività anqas qawwija. Barra minn dan, jistgħu jirriżultaw għajiet mutageniċi minhabba fin-nuqqas ta' riparazzjoni, riparazzjoni hażina jew replikazzjoni hażina tal-lezjonijiet fid-DNA. L-estensjoni tar-rispons tal-UDS ma tagħtix indikazzjoni dwar il-fedeltà tal-proċess ta' riparazzjoni. B'żieda ma' dan, huwa possibbli li li mutagen jirreaġixxi mad-DNA iżda l-hsara fid-DNA ma tisewwix permezz ta' proċess ta' riparazzjoni exissa. In-nuqqas ta' informazzjoni speċifika dwar l-attività mutagenika mogħtija mit-test tal-UDS huwa kompensat bis-sensittività potenzjali ta' dan il-punt aħhari għax jiġi mkejjet fil-ġenom u shh.

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali Taqsima B.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Ċelloli li qed jissewew: Ċelloli li l-numru ta' grani nukleari netti tagħhom (NNG) huwa oghla minn valur determinat minn qabel, li għandu jiġi ġustifikat fil-laboratorju li fih jitwettaq it-test.

Grani nukleari netti (NNG): miżura kwantitattiva għall-attività UDS taċ-Ċelloli f'testijiet UDS awtoradjografiċi, kalkolati billi jitnaqqas in-numru medju ta' grani ċitoplasmici f'arej ċitoplasmici nuklei ekwivalenti (CG) min-numru ta' grani nukleari (NG): $NNG = NG - CG$. L-għadd ta' NNG huma kalkolati għal Ċelloli individwali u imbagħad addizzjonati ma' Ċelloli f'kultura, f'kulturi paralleli, eċċ.

▼B

Sintesi DNA mhux skedata (UDS): sintesi ta' riparazzjoni DNA wara l-exissjoni u t-tnehhija ta' biċċa mid-DNA li jkun fiha reġjun ta' hsara miġjuba minn sustanzi kimiċi jew aġenti fiżiċi.

1.3. PRINĊIPJI TA' DAN IL-METODU TA' TEST

It-test tal-UDS b'Ċelloli tal-fwied ta' mammiferi *in vivo* jindika sintesi ta' riparazzjoni DNA wara l-exissjoni u t-tnehhija ta' biċċa mid-DNA li jkun fiha reġjun ta' hsara miġjuba minn sustanzi kimiċi jew aġenti fiżiċi. It-test hu normalment msejjes fuq l-inkorporazzjoni ta' 3H-TdR fiċ-ċelluli DNA tal-fwied li għandhom frekwenza baxxa ta' Ċelloli fil-fasi S taċ-ċiklu taċ-Ċelloli. It-tehid ta' 3H-TdR jiġi normalment stabbilit bl-awdjoradjografija, għax dan il-metodu ta' teknika mhuwiex suxxettibbli għal indhil minn Ċelloli fil-fasi S bħal, per eżempju, kontegġ ta' xintillazzjoni fil-fasi likwida.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1. **Preparazzjonijiet**

1.4.1.1. *Selezzjonijiet ta' l-ispeċi ta' annimali*

Normalment jintuża l-far, minkejja li tista' tintuża kull speċi xierqa ta' mammiferi. Għandhom jintużaw partijiet ġenerali użati fil-laboratorju ta' annimali żgħar b'saħħithom adulti. Fil-bidu ta' l-istudju l-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali għandha tkun minima u ma tkunx iżjed minn $\pm 20\%$ tal-piż medju għal kull wieħed mis-sessi.

1.4.1.2. *Kondizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu*

Jiġu applikati l-kundizzjonijiet ġenerali msemmija fl-Introduzzjoni ġenerali għat-Taqsima B għalhekk il-mira għall-umdità għandha tkun ta' 50 sa 60 %.

1.4.1.3. *Preparazzjoni ta' l-annimali*

Annimali b'saħħithom żgħar adulti jiġu assenjati mingħajr ordni għall-gruppi ta' kontroll u ta' trattament. Il-gaġeġ għandhom ikunu rrangati b'tali mod li jitnaqqsu l-effetti possibbli mil-fatt li jitqiegħdu f'gaġeġ. L-annimali jiġu identifikati wiehied wiehied u jinżammu fil-gaġeġ tagħhom għallinqas għal hamest ijiem qabel ma jibda l-istudju biex jippermetti żmien biex jidraw il-kundizzjonijiet fil-laboratorju.

1.4.1.4. *Sustanza tat-test/preparazzjoni*

Sustanzi tat-test solidi għandhom jiġu mdewwbin jew sospizi f'solventi jew kontenituri xierqa u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel it-trattament ta' l-annimali. Sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiġu trattati direttament jew dilwiti qabel it-trattament. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet godda għas-sustanza tat-test kemm-il darba l-informazzjoni dwar l-istabbiltà ma turix laċċettabbiltà tal-ħażna.

1.4.2. **Kundizzjonijiet tat-test**

1.4.2.1. *Solvent/mezz*

Is-solvent/mezz ma għandux jipproduċi effetti tossiċi fil-livelli ta' doza użata, u ma għandu jkun hemm l-ebda suspett ta' reazzjoni kimika mas-sustanza tat-test. Jekk jintużaw solventi/mezzi oħra minflok dawk l-aktar magħrufa, l-inkluzjoni tagħhom għandha tkun appoġġata b'informazzjoni li tindika l-kompatibiltà tagħhom. Hu rakkomandat li kemm jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/mezz akkwuż.

▼B**1.4.2.2. Kontrolli**

Għandhom jiġu inklużi f'kull parti indipendenti ta' l-esperiment kontrolli pożittivi u negattivi fl-istess hin (solvent/mezz). Hlief għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi tal-kontrolli għandhom jiġu trattati bl-istess mod bħall-annimali fil-grupp ta' trattament.

Il-kontrolli pożittivi għandhom ikunu sustanzi magħrufa li jipproduċu UDS meta somministrati f'livelli ta' espożizzjoni li huma meqjusa li jagħtu zieda li wiehed jista' jinnota fuq l-isfond. Kontrolli pożittivi li jehtiegu attivazzjoni metabolika għandhom jintużaw f'dożi li jgħallqu rispons moderat (4). Id-dożi jistgħu jingħazlu sabiex l-effetti jkunu ċari iżda ma jiżvelawx immedjatement l-identità tad-dijapożittivi kodifikati lil min jaqrahom. Eżempji ta' sustanzi ta' kontrolli pożittivi jinkludu:

Hinijiet ta' teħid ta' kampjuni	Sustanza	Nru CAS	Nru EINECS
Tehid ta' kampjuni kmieni (2 sa 4 sigħat)	N-nitrosodimetilamina	62-75-9	200-249-8
Tehid ta' kampjuni tard (12 sa 16-il siegħa)	N-2-fluworenilacetamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi oħra xierqa. Huwa aċċettabbli li l-kontrolli pożittivi għandu jiġi somministrat minn rotta differenti mis-sustanza tat-test.

1.5. PROCEDURA**1.5.1. Numru u sess ta' l-annimali**

Għandu jintuża numru adegwat ta' annimali biex titqies il-varjazzjoni bijoloġika naturali f'rispons ta' test. In-numru ta' annimali għandu jkun għall-inqas tliet annimali analizzabbli kull grupp. Fejn ikun għe akkumulat database storiku sinjifikattiv, annimal wiehed jew tnejn biss jkunu meħtieġa għall-gruppi ta' kontrolli pożittivi u negattivi fl-istess hin.

Jekk fil-hin li jsir l-istudju jkun hemm informazzjoni disponibbli minn studji fl-istess speċje u li jużaw l-istess rotta ta' espożizzjoni li juru li ma hemmx differenzi sostanzjali fit-tossicità bejn is-sessi, allura jkun biżżejjed li t-test isir fuq sess wiehed, preferibbilment dak maskil. Fejn l-espożizzjoni umana għall-kimiċi tista' tkun speċifika skond is-sess, bħal ma hu per eżempju għal ċerti aġenti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq.

1.5.2. Skeda tat-trattament

Is-sustanzi tat-test ġeneralment jiġu somministrati fi trattament singolu.

1.5.3. Livelli tad-doża

Normalment, jintużaw għall-inqas żewġ livelli ta' doża. L-ogħla doża hija mfissra bħala d-doża li tipproduċi sinjali ta' tossicità hekk li livelli oghla tad-doża, bbażati fuq l-istess reġim ta' dożaġġ, huma mistennija li jikkawżaw il-mewt. Ġeneralment, l-inqas doża għandha tkun minn 50 % sa 25 % ta' l-ogħla doża.

▼B

Is-sustanzi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'dozi baxxi mhux tossiċi (bħal ma huma ormoni u nitroġeni) jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' l-issettjar tad-dozi u għandhom jiġu valutati fuq bażi ta' każ b'każ. Jekk isir studju biex tinstab il-medda għax ma jkunx hemm disponibbli informazzjoni xierqa, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, billi jintużaw l-istess speċji, karatteristiċi, sess u dożaġġ ta' trattament li jintuża fl-istudju prinċipali.

L-ogħla doża tista' ukoll tfisser id-doża li tipproduċi xi indikazzjoni ta' tossiċità fil-fwied (eż. nukleji piknotiċi).

1.5.4. Test tal-limitu

Jekk test ta' doża waħda ta' livell ta' għall-inqas 2 000 mg/kg piż tal-ġisem, meta jitwettaq trattament wiehed, jew bħala żewġ trattamenti fl-istess ġurnata, ma jipproduċix effetti tossiċi li wiehed jinduna bihom, u jekk ma tkunx mistennija l-ġenotossiċità fuq il-bażi ta' l-informazzjoni minn sustanzi strutturalment relatati, allura ma jitqiesx li jkun neċessarju li jsir studju komplet. L-espożizzjoni umana mistennija tista' tindika l-htieġa ta' livell ogħla ta' doża li għandu jintuża fit-test tal-limitu.

1.5.5. Somministrazzjoni ta' doži

Normalment is-sustanza tat-test tiġi somministrata b'gavage billi jintuża tubu għall-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni. Fejn ikunu ġustifikati, jistgħu jiġu aċċettati rotot oħra ta' espożizzjoni. Madankollu r-rotta intraperitoneali mhix rakkomandata għax tista' tesponi l-fwied direttament għas-sustanza tat-test minflok permezz tas-sistema ċirkulatorja. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jiġi somministrat b'gavage jew b'injezzjoni f'hin wiehed jiddependi fuq il-qies ta' l-animall tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 2 ml/100g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ogħla minn dawn għandu jkun ġustifikat. Hlief fil-każ ta' sustanzi li jirritaw jew korrożivi li normalment juru effetti aggravati b'konċentrazzjonijiet ogħla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha titnaqqas bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fuq il-livelli kollha tad-doża.

1.5.6. Preparazzjoni ta' Ċelloli tal-fwied

Iċ-Ċelloli tal-fwied huma ppreparati minn annimali ttrattati normalment 12 sa 16-il siegħa wara t-tehid tad-doża. Generalment ikun meħtieġ tehid ta' kampjuni iehor addizzjonali u aktar kmieni (normalment sagħtejn sa erba' sigħat wara t-trattament) kemm-il darba ma jkunx hemm rispons pożittiv ċar fi 12 sa 16-il siegħa. Madankollu t-tehid ta' kampjuni jista' jsir f'hinijiet oħra meta jkun ġustifikat fuq il-bażi ta' informazzjoni tossikokinetika.

Normalment il-kulturi ta' perjodu qasir ta' Ċelloli ta' manniferi jiġu stabbiliti billi l-fwied jitgħatta fil-post bil-kollagenas u billi Ċelloli tal-fwied dissoċjati godda jithallew jingħaqdu ma' superfiċji xierqa. Ċelloli tal-fwied minn annimali ta' kontroll negattiv għandu jkollhom vijabilità ta' għall-inqas 50 %.

1.5.7. Determinazzjoni ta' UDS

Iċ-Ċelloli tal-fwied iżolati godda tal-mammiferi huma inkubati normalment b'medjum li jkun fih 3H-TdR għal tul ta' zmien xieraq, eż. tliet sigħat sa tmienja. Fl-aħħar tal-perjodu ta' inkubazzjoni, il-medjum għandu jitneħħa miċ-Ċelloli, li imbagħad jistgħu jiġu inkubati b'medjum li jkun fih eċċess ta' timidina mhux ittik-kettjata biex tnaqqas r-radjuattività mhux inkorporata ('cold chase'). Imbagħad iċ-Ċelloli jiġu mlahalha, ffissati u mnixxfen. Għal hini-jiet ta' inkubazzjoni itwal, il-cold chase jista' ma jkunx neċessarju. Id-dijapożittivi jixxarbu b'emulsjoni awtoradjografika, jiġu esposti fid-dlam (eż. imkesshin għal sebat ijiem sa erbatax-il ġurnata), żviluppatti, mogħtika l-kulur, u jingħaddu il-grani tal-fidda esposti. Jiġu ppreparati żewġ jew tliet dijapożittivi minn kull annimal.

▼B**1.5.8. Analizi**

Il-preparazzjonijiet tad-dijapożittivi ghandu jkollhom bizżejjed Ċelloli ta' morfologija normali li jippermettu valutazzjoni xierqa tal-UDS. Il-preparazzjonijiet jiġu eżaminati mikroskopikament għal sinjali ta' tossiċità qawwija (eż. piknozi, livelli ridotti ta' radjutik-kettjar).

Id-dijapożittivi għandhom jiġu kodifikati qabel ma jibda l-ghadd tal-grani. Normalment jingħaddu 100 ċellula minn kull animal minn għall-inqas żewġ dijapożittivi; l-ghadd ta' inqas minn 100 ċellula/animal għandu jkun ġustifikat. In-numru ta' grani ma jingħaddx għan-nuklei tal-fasi S, iżda tista' tiġi registrata l-proporzjon ta' Ċelloli tal-fasi S.

L-ammont ta' inkorporazzjoni ta' 3H-TdR fin-nuklei u ċ-ċitoplasma ta' Ċelloli morfologikament normali, kif ppruvat bid-deposizzjoni ta' grani tal-fidda, għandu jiġi stabbilit b'metodi xierqa.

2. DATA**2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI**

Għandha tingħata informazzjoni individwali dwar dijapożittivi u animal. Barra minn dan, L-informazzjoni kollha għandha titqassar f'forma ta' tabella. L-ghadd ta' g rani nukleari netti (NNG) għandu jiġi kalkolat għal kull ċellula, għal kull animal u għal kull doża u hin billi jitnaqqsu l-ghadd ta' CG mill-ghadd ta' NG. Jekk jingħaddu “iċ-Ċelloli li qed jissewwew”, il-kriterji għaċ-Ċelloli li qed jissewwew għandhom ikunu ġustifikati u msejsa fuq informazzjoni storika u ta' kontroll negattiv fl-istess hin. Riżultati numeriċi jistgħu jiġu valutati b'metodi statistiċi. Jekk jintużaw, it-testijiet statistiċi għandhom jingħazlu u jkunu ġustifikati qabel ma jitwettaq l-istudju.

2.2. VALUTAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Eżempji ta' kriterji għal rispons pożittiv/negattiv jinkludu:

pożittiv	(i) il-valuri NNG oghla minn limitu determinat minn qabel li hu ġustifikat fuq il-bażi ta' informazzjoni storika tal-laboratorju; jew
	(ii) il-valuri NNG sinjifikatament oghla minn kontroll fl-istess hin;
negattiv	(i) il-valuri NNG fil-limitu/taht il-limitu ta' kontroll storiku jew
	(ii) il-valuri NNG mhux sinjifikatament oghla minn kontroll fl-istess hin

▼B

Għandha tiġi kkunsidrata r-rilevanza bijoloġika ta' l-informazzjoni: jiġifieri għandhom jitqiesu l-parametri bħal ma huma l-varjazzjoni bejn l-annimali, r-relazzjoni għar-rispons għad-doża u ċ-ċitossicità. Bħala għajnuna fil-valutazzjoni tar-riżultati tat-testijiet, jistgħu jintużaw metodi ta' statistika. Madankollu, s-sinjifikanza statistika ma għandhiex tkun l-uniku fattur għal rispons pożittiv.

Għalkemm kważi l-esperimenti kollha jagħtu riżultati ċari pożittivi jew negattivi, f'każijiet rari l-informazzjoni ssettjata ma tippermettix li jsir għidizzju definittiv dwar l-attività ta' sustanza tat-test. Ir-riżultati jistgħu jibqgħu ekwivoċi u inċerti irrispettivament min-numru ta' drabi li jirrepeti ruhu l-esperiment.

Riżultat pożittiv minn test UDS b'Ċelloi tal-fwied tal-mammiferi *in vivo* jindika li s-sustanza tat-test tohloq ħsara fid-DNA taċ-Ċelloi tal-fwied tal-mammiferi *in vivo* li tista' tisewwa b'sintesi tad-DNA mhux skedata *in vitro*. Riżultat negattiv jindika li, taht il-kundizzjonijiet tat-test, is-sustanza tat-test ma tohloq ħsara fid-DNA li tiġi żvelata b'dan it-test.

Għandha tiġi diskussa l-probabilità li s-sustanza tat-test tilhaq iċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew speċifikament it-tessut immirat (eż. tossicità sistemika).

3. **RAPPORTAĠĠ**

RAPPORT TAT-TEST

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

Solvent/mezz:

- ġustifikazzjoni dwar l-għażla tal-mezz,
- solubilità u stabbiltà tas-sustanza tat-test fis-solvent/mezz, jekk magħrufa.

Annimali ttestjati:

- speċi/razza użati;
- numru, età u sess ta' l-annimali;
- għejjun, kundizzjonijiet dwar fejn jinżammu, dieta, eċċ.;
- piż individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test, inkluża l-medda ta' piż tal-ġisem, mezz u devjazzjoni standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

- kontrolli pożittivi u negattivi (mezz/solvent);
- informazzjoni mill-istudju dwar il-medda, jekk ikun sar;
- raġuni prinċipali għall-għażla ta' livell tad-doża;
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test;
- dettalji dwar is-somministrazzjoni tas-sustanza tat-test;
- raġuni prinċipali dwar ir-rotta ta' somministrazzjoni;
- metodi biex jiġi verifikat li s-sustanza tat-test waslet għaċ-ċirkolazzjoni ġenerali jew it-tessut immirat, jekk tkun applikabbli;
- konverżjoni mill-koncentrazzjoni (ppm) tas-sustanza tat-test dieta/ilma għax-xorb għad doża attwali (mg/kg piż tal-ġisem/jum) jekk tkun applikabbli;

▼B

- dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma;
- deskrizzjoni dettaljata dwar l-iskedi ta' trattament u teħid ta' kampjuni;
- metodi biex titqies it-tossicità;
- metodu tal-preparazzjoni u kultura taċ-Ċelloli tal-fwied;
- teknika awtoradjografika użata;
- numru ta' diġapozittivi ppreparati u numru ta' Ċelloli li jinghaddu;
- kriterji ta' valutazzjoni;
- kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwi-voċi.

Riżultati:

- valuri medji individwali tad-diġapozittivi, ta' l-annimali u ta' gruppi għal grani nuklei, grani ċitoplasmici, u grani nukleari netti;
- relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, jekk tkun disponibbli;
- valutazzjoni statistika, jekk ikun hemm;
- sinjali ta' tossicità;
- informazzjoni dwar kontrolli pożittivi u negattivi (solvent/mezz) fl-istess ħin;
- informazzjoni dwar kontrolli pożittivi u negattivi (solvent/mezz) storika bil-medda, mezzi u devjazzjonijiet standard;
- numru ta' Ċelloli li qed jissewwew, jekk magħruf;
- numru ta' Ċelloli tal-fasi S, jekk magħruf;
- vijabilità taċ-ċelluli.

Diskussjoni dwar ir-riżultati.

Kunkluzjonijiet.

4.**REFERENZI**

- (1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In vivo* Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In vitro* and *In vivo*, Mutation Res., 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In vivo/In vitro* DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In vivo/In vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553-562.

▼B**B.40. IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAR-REŻISTENZA ELETTRIKA TRANSKUTANJA (TER – TRANSCUTANEAL ELECTRICAL RESISTANCE)****1. IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 430 (2004).

1.1. DAHLA

Il-korrożjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' dannu irriverribbli fit-tessut tal-ġilda wara l-applikazzjoni ta' materjal tat-test [kif definit mis-Sistema Globali Armonizzata għall-Klassifika u t-Tikkettjar ta' Sustanzi u Komposti Kimiċi (GHS – *Globally Harmonised System*)] (1). Dan il-metodu jipprovdi proċedura li biha l-istima tal-korrożività ma ssirx f'annimali hajjin.

L-istima tal-korrożività tal-ġilda involviet tipikament l-użu ta' annimali tal-laboratorju (2). Itthassib għall-uġiġh u t-tbatija ta' l-annimali involuti f'din il-proċedura ġie indirizzat fir-reviżjoni tal-Metodu tat-Test B.4 li jippermetti d-determinazzjoni tal-korrożività tal-ġilda bl-użu ta' metodi alternattivi, *in vitro*, li jevitaw l-uġiġh u t-tbatija.

L-ewwel pass biex jiġu definiti testijiet alternattivi li jistgħu jintużaw għall-ittestjar tal-korrożività tal-ġilda kien it-twetliq ta' studji tal-validazzjoni minn qabel (3). Wara dan, studju ta' validazzjoni formali ta' metodi *in vitro* biex tiġi stmata l-korrożjoni tal-ġilda (4)(5) ġie mwettaq (6)(7)(8). Ir-rizultat ta' dawn l-istudji u letteratura oħra ppubblikata wasslu għar-rakkomandazzjoni li jistgħu jintużaw dawn it-testijiet għall-istima tal-korrożività tal-ġilda *in vivo* (9)(10)(11): it-test tal-mudell tal-ġilda umana (ara l-Metodu tat-Test B.40bis) u t-test tar-reżistenza elettrika transkutanja (dan il-Metodu).

Studji ta' validazzjoni u studji oħrajn validati rrapportaw li l-figura tar-reżistenza elettrika transkutanja (TER) l-ġilda tal-firien (12)(13) tista' tiddiskrimina fis-sod bejn il-korrożivi tal-ġilda magħrufin u sustanzi mhux korrożivi (5)(9).

It-test deskritt f'dan il-Metodu jippermetti l-identifikazzjoni ta' sustanzi u komposti kimiċi korrożivi. Jippermetti wkoll l-identifikazzjoni ta' sustanzi u komposti mhux korrożivi meta tkun sostnuta mill-piż ta' determinazzjoni tal-provi bl-użu ta' informazzjoni oħra eżistenti (eż. pH, struttura-attività-relazzjonijiet, data dwar l-umani u/jew l-annimali) (1)(2)(11)(14). Ma jagħtix informazzjoni dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, u lanqas ma jippermetti s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi korrożivi kif permess fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (GHS) (1).

Għal evalwazzjoni shiha ta' l-effetti lokali fuq il-ġilda wara espożizzjoni dermali unika, huwa rakkomandat li tiġi segwita l-istrateġija ta' l-ittestjar sekwenzjali kif meħmuża mal-Metodu tat-Test B.4 (2) u provduta fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (1). Din l-istrateġija ta' l-ittestjar tinkludi t-twetliq ta' testijiet *in vitro* għall-korrożjoni tal-ġilda (kif deskritt f'dan il-metodu) u l-irritazzjoni tal-ġilda qabel ma jitqies l-ittestjar fl-annimali hajjin.

▼B

1.2.

DEFINIZZJONI

Il-korrożjoni tal-ġilda *in vivo*: hija l-produzzjoni ta' dannu irri-versibbli tal-ġilda: jiġifieri nekrozi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrożivi huma tipifikati minn ulċeri, ħruġ ta' demm, qxur bid-demm, u sa l-aħħar ta' l-osservazzjoni ta' 14-il jum, tnaqqis ta' kulur minhabba li tibjad il-ġilda, żoni shah ta' *alopecia*, u ċikatriċi. Il-histopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

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

IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA**Tabella 1****Il-Kimiċi ta' Riferenza**

Isem	Nru EINECS	Nru CAS	
1,2-Diaminopropane	201-155-9	78-90-0	Korroziv Hafna
Aċidu Akriliku	201-177-9	79-10-7	Korroziv Hafna
2-tert. Butylphenol	201-807-2	88-18-6	Korroziv
Idrossidu tal-potassju (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korroziv
Aċidu sulfuriku (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korroziv
Aċidu Oktanoiku (aċidu kapriliku)	204-677-5	124-07-02	Korroziv
4-Amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Mhux Korroziv
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Mhux Korroziv
Phenethyl bromide	203-130-8	103-63-9	Mhux Korroziv
Tetrachloroethylene	204-825-9	27-18-4	Mhux Korroziv
Aċidu izosteariku	250-178-0	30399-84-9	Mhux Korroziv
4-(Methylthio)-benzaldehyde	222-365-7	3446-89-7	Mhux Korroziv

Il-parti l-kbira tal-kimiċi elenkati huma meħuda mil-lista ta' kimiċi magħżula għall-istudju internazzjonali ta' validazzjoni ECVAM (4). L-għażla tagħhom hija bbażata fuq dawn il-kriterji li ġejjin:

- i) għaddu indaq ta' sustanzi korrożivi u mhux korrożivi;

▼B

- ii) sustanzi disponibbli kummerċjalment li jkopru l-parti l-kbira tal-klassijiet ta' kimiċi rilevanti;
- iii) l-inkluzjoni ta' sustanzi korrożivi hafna kif ukoll dawk inqas korrożivi sabiex tkun possibbli d-diskriminazzjoni bbażata fuq il-potenza korrożiva;
- iv) l-għażla tal-kimiċi li jistgħu jiġu mmanigġġjati f laboratorju mingħajr periklu serju minbarra l-korrożività.

IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-materjal tat-test huwa applikat għal mhux aktar minn 24 siegħa fuq l-uċuħ epidermali ta' ċrieki ta' ġilda f sistema ta' test b'żewġ kompartimenti fejn iċ-ċrieki ta' ġilda jahdmu bħala s-separazzjoni bejn il-kompartimenti. Iċ-ċrieki tal-ġilda jittiehdu minn firien maqtula b'mod uman ta' età ta' 28-30 jum. Il-materjali korrożivi huma identifikati mill-abilità tagħhom li jipproduċu telf ta' integrità normali ta' *stratum corneum* u tal-funzjoni ta' barrjera, li jitkejjel bħala tnaqqis fit-TER 'l isfel minn livell ta' limitu (12). Għat-TER tal-firien, intgħazel valur ta' limitu ta' 5 kΩ ibbażat fuq data estensiva għal varjetà kbira ta' kimiċi fejn il-maġġoranza l-kbira ta' valuri kienu jew sew aktar 'il fuq (spiss > 10 kΩ), jew sew aktar 'l isfel (spiss < 3 kΩ) minn dan il-valur (12). B'mod generali, il-materjali li mhumx korrożivi fl-animalli iżda li huma irritanti jew mhux irritanti ma jnaqsux it-TER inqas minn dan il-valur ta' limitu. Barra minn hekk, l-użu ta' preparazzjonijiet ta' ġilda oħrajn jew tagħmir ieħor jista' jibdel il-valur ta' limitu, li jehtieg aktar validazzjoni.

Huwa inkorporat fil-proċedura tat-test pass li jorbot iż-żebgħa sabiex isir it-test ta' konferma tar-risultati pożittivi fit-TER inkluzi valuri madwar 5 kΩ. Il-pass li jorbot iż-żebgħa jiddetermina jekk iż-żjieda fil-permeabilità ionika hijiex minhabba qirda fizika tal-*istratum corneum*. Il-metodu tat-TER bl-użu tal-ġilda tal-firien vera li jista' jibassar il-korrożività *in vivo* fil-fenek evalwat taht il-Metodu tat-Test B.4 (2). Għandu jiġi nnutat li t-test tal-fenek *in vivo* huwa konservattiv hafna fir-rigward tal-korrożività tal-ġilda u l-irritazzjoni tal-ġilda meta mqabbel mat-test tal-parti tal-ġilda umana (15).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**L-Animalli**

Il-firien huma l-ispeċi ta' għażla minhabba li s-sensittività tal-ġilda tagħhom għall-kimiċi f dan it-test diġa ntweriet qabel (10). L-età (meta tingabar il-ġilda) u l-ispeċi tal-far huma partikolarment importanti biex jiġi żgurat li l-follikoli tax-xahar fil-fażi dormanti qabel ma jibda t-tkabbir tax-xahar adult.

▼B

Ix-xahar dorsali u tal-ġenb minn firien żgħar, ta' età ta' madwar 22 jum (derivati minn Wistar jew fergha komparabbli), jitnehha bir-reqqa b'qattiegħ ix-xahar żgħir. Imbagħad l-annimali jiġu mahsula billi jintmeshu bl-attenzjoni, filwaqt li l-parti bix-xagħar maqtuġħ tiġi mgħarrqa ftahlita antibijotika (li per eżempju, fuha streptomycin, penisilin, chloramphenicol, u amphotericin, f'koncentrazzjonijiet li huma effettivi biex jinibixxu t-tkabbir tal-batterji). L-annimali jergħu jiġu mahsula bl-antibijotiċi fit-tielet jew ir-raba' jum wara l-ewwel hasla u jintużaw fi żmien 3 ijiem wara t-tieni hasla, meta l-*istratum corneum* ikun irkupra mit-tneħħija tax-xahar.

Il-preparazzjoni taċ-ċrieki tal-ġilda

L-annimali jiġu maqtula b'mod uman meta jkollhom 28-30 jum; l-età hija kritika Il-ġilda dorso-laterali ta' kull animal imbagħad titnehha u jitnehħielha x-xaham subkutanju eċċessiv billi jitqaxxar bl-attenzjoni minn mal-ġilda Iċ-ċrieki tal-ġilda, ta' djametru ta' madwar 20 mm kull wiehed, jitnehħew. Il-ġilda tista' tiġi mahżuna qabel ma jintużaw iċ-ċrieki fejn jidher li d-data tal-kontroll pożittiva u negattiva hija ekwivalenti għal dik miksuba b'ġilda friska.

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

Qabel ma jibdew it-testijiet, ir-reżistenza elettriċa ta' żewġ ċrieki tal-ġilda tiġi mkejla bħala proċedura tal-kontroll tal-kwalità għal kull ġilda ta' l-annimali. Iż-żewġ ċrieki għandhom jagħtu valuri ta' reżistenza akbar minn 10 k Ω biex jintużaw il-bqija taċ-ċrieki għat-test. Jekk il-valur tar-reżistenza huwa inqas minn 10 k Ω , il-bqija taċ-ċrieki minn dik il-ġilda għandha tintrema.

L-applikazzjoni tat-test u s-sustanzi tal-kontroll

Għandhom jintużaw kontrolli konkurrenti pożittivi u negattivi biex kull studju jiżgura hidma tajba tal-mudell esperimentali. Għandhom jintużaw iċ-ċrieki tal-ġilda minn animal wiehed. Is-sustanzi tal-kontroll pożittivi jew negattivi sugġeriti huma 10 M aċidu idrokloriku u ilma ddistillat, rispettivament.

Is-sustanzi tat-test likwidi (150 μL) huma applikati b'mod uniformi mal-wiċċ epidermali ġewwa t-tubu. Meta jiġu ttestjati materjali solidi, huwa applikat ammont biżżejjed ta' solidu b'mod livell fuq iċ-ċirku sabiex jiġi żgurat li l-wiċċ kollu ta' l-epidermis huwa kopert. Jiżdied l-ilma deionizzat (150 μL) fuq is-solidu u t-tubu jiġi aġitat bil-mod. Sabiex jinkiseb il-kuntatt massimu mal-ġilda, is-solidi jistgħu jkunu jridu jissahħnu sa 30 °C biex tinhall jew tiġi mrattba s-sustanza tat-test, jew mithuna sabiex jipproduċu materjal granurali jew terra.

▼B

Jintużaw tliet ċrieki tal-ġilda għal kull sustanza tat-test u tal-kontroll. Is-sustanzi tat-test huma applikati għal 24 siegħa f' temperatura ta' 20-23 °C. Is-sustanza tat-test titneħħa bil-hasil b'merżuq ta' ilma tal-vit sa 30 °C sakemm ma jista' jitneħħa ebda materjal iehor.

II-kejl tat-TER

L-impedenza tal-ġilda titkejjel bħala TER u titkejjel bl-użu ta' kurrent alternat, ta' vultaġġ baxx ta' Wheatstone databridge (13). L-ispeċifikazzjonijiet ġenerali tal-*bridge* huma vultaġġ operattiv ta' 1-3 Volt, kurrent sinus jew rettangolari alternat ta' 50 - 1 000 Hz, u firxa tal-kejl ta' mhux inqas minn 0,1 - 30 kΩ. Id-*databridge* użat fl-istudju tal-validazzjoni jkejjel l-induttanza, l-kapaċitanza u r-reżistenza sa valuri ta' 2 000 H, 2 000 μF, u 2 MΩ, rispettivamente bi frekwenzi ta' 100 Hz jew 1 kHz, bl-użu ta' valuri serje jew paralleli. Għal-ghanijiet tal-korrożività tat-TER il-kejl tal-figura huwa rrekordjat f' reżistenza, bi frekwenzi ta' 100 Hz u bl-użu ta' valuri serje. Qabel ma titkejjel ir-reżistenza elettriċa, it-tensjoni tal-wiċċ tal-ġilda titnaqqas billi jiżdied volum suffiċjenti ta' etanol 70 % biex ikopri l-epidermis. Wara ftit sekondi, l-etanol jitneħħa mit-tubu u mbagħad t-tessut jiġi idratat billi tiżdied tahlita ta' 3 mL MgSO₄ (154 mM). L-elettrodi tad-*databridge* jitqiegħdu fuq kull naha taċ-ċirku tal-ġilda biex titkejjel ir-reżistenza f' kΩ/ċirku tal-ġilda (Figura 1). Id-dimensjonijiet ta' l-elettrodi u t-tul ta' l-elettrodu espost taht il-*crocodile clips* jintwerew fil-Figura 2. Il-molla mwahhla ma' l-elettrodu ta' ġewwa tistrieħ fuq il-parti ta' fuq tat-tubu PTFE matul il-kejl tar-reżistenza sabiex jiġi żgurat tul konsistenti ta' l-elettrodu huwa meqrud fit-tahlita MgSO₄. L-elettrodu ta' barra jitqiegħed ġewwa l-parti reċettorja sabiex jistrieħ fuq il-qiegħ ta' dik il-parti. Id-distanza bejn il-molla u l-qiegħ tat-tubu PTFE tinzamm kostanti (Figura 2), għaliex din id-distanza taffettwa l-valur ta' reżistenza miksub. Għalhekk, id-distanza bejn l-elettrodu ta' ġewwa u ċ-ċirku tal-ġilda għandha tkun kostanti u minimali (1-2 mm).

Jekk il-valur tar-reżistenza mkejjel huwa akbar minn 20 kΩ, dan jista' jkun minhabba li l-fdalijiet tas-sustanza tat-test jiksu l-wiċċ eipdermali taċ-ċirku tal-ġilda. Wiehed jista' jipprova jkompli jneħhi din il-kisja, per eżempju, billi jissigilla t-tubu PTFE bis-seba' l-kbir bl-ingwanta u mbagħad iħawdu għal madwar 10 sekondi; it-tahlita ta' MgSO₄ tintrema u jerga' jsir il-kejl tar-reżistenza b' MgSO₄ ġdid.

Il-karatteristiċi u d-dimensjonijiet ta' l-apparat tat-test u l-proċedura ta' l-esperiment użati jistgħu jinfluwenzaw il-valuri tat-TER miksuba. Il-limitu korrożiv ta' 5 kΩ ġie żviluppat mid-data miksuba fl-apparat u l-proċedura speċifiċi użati f'dan il-Metodu. Jistgħu jgħoddu valuri differenti tal-limitu u tal-kontroll jekk jinbidlu l-kundizzjonijiet tat-test jew jintuża apparat differenti. Għalhekk, huwa meħtieġ li jiġu kkalibrati l-metodoloġija u l-valuri tal-limiti tar-reżistenza bl-ittestjar ta' serje ta' standards ta' riferenza magħżula mill-kimiċi fl-istudju tal-validazzjoni (4) (5), jew minn klassijiet tal-kimiċi li huma simili għal dawk li qed jiġu investigati. Sett ta' kimiċi ta' riferenza xierqa jintwera fit-Tabella 1.

▼B

Il-Metodi ta' l-Irbit taż-Żebgħa

L-espożizzjoni ta' xi materjali mhux korrożivi tista' tirriżulta fi tnaqqis ta' reżistenza 'l isfel mil-limitu ta' 5 kΩ li jippermetti l-mogħdija ta' joni mi l-*istratum corneum*, u b'hekk titnaqqas ir-reżistenza elettrika (5). Per eżempju, l-organiċi newtri u l-kimiċi li għandhom karatteristiċi attivi fil-wiċċ (inklużi deterġenti, emulsifikanti u surfattanti oħrajn) jistgħu jneħħu l-lipidi tal-gilda li l-barriera jagħmluha aktar permeabbli għall-ioni. Għalhekk, jekk il-valuri tat-TER huma inqas minn jew madwar 5 kΩ fin-nuqqas ta' dannu viżwali, tista' ssir stima tal-penetrazzjoni taż-żebgħa fuq iċ-ċelloli tal-kontroll u dawk ittrattati sabiex jiġi determinat jekk il-valuri tat-TER miksuba kinux ir-riżultat tal-permeabilità akbar tal-gilda, jew tal-korrożjoni tal-gilda (3)(5). Fil-każ ta' l-aħħar fejn jinqasam l-*istratum corneum*, iż-żebgħa sulforhodamine B, meta applikata mal-wiċċ tal-gilda tippenetra malajr u ttebba' t-tessut ta' taħt. Din iż-żebgħa partikolari hija stabbli għal varjetà kbira ta' kimiċi u mhijiex affettwata mill-proċedura ta' l-estrazzjoni deskritta hawn taħt.

L-applikazzjoni u t-tneħħija taż-żebgħa Sulforhodamine B

Wara l-istima tat-TER, is-sulfat tal-manjeżju jintrema mit-tubu u l-gilda tiġi eżaminata bir-retta għal dannu ovvj. Jekk ma hemm ebda dannu kbir ovvj, iż-żebgħa Sulforhodamine B dye (Acidu Ahmar 52; C.I. 45100; EINECS Numru 222-529-8; CAS numru 3520-42-1), 150 µL ta' taħ lita ta' 10 % (w/v) fl-ilma distillat tiġi applikata fuq il-wiċċ epidermali ta' kull ċirku tal-gilda għal sagħtejn. Dawn iċ-ċrieki tal-gilda mbagħad jinhaslu bl-ilma tal-vit sa temperatura ambjentali għal madwar 10 sekonda biex titneħħa ż-żebgħa eċċessiva/mhux użata. Kull ċirku tal-gilda mbagħad jitneħħa bl-attenzjoni mit-tubu tal-PTFE u jitqiegħed fi flixkun (eż. flixkun tal-ħġieġ tax-xintillazzjoni ta' 20 mL) li fih ilma deionizzat (8 mL). Il-fliexken jiġu aġitati bil-mod għal 5 minuti sabiex titneħħa żebgħa żejda mhux użata. Din il-proċedura ta' tlahliħ imbagħad hija ripetuta, u wara dan jitneħħew iċ-ċrieki tal-gilda u jitqiegħdu fi flixken li fihom 5 mL ta' 30 % (w/v) *sodium dodecyl sulphate* (SDS) fl-ilma distillat u huma inkubati mal-lejl f'temperatura ta' 60 °C.

Wara l-inkubazzjoni, iċ-ċirku tal-gilda jitneħħa u jintrema u l-bqija tat-tahlita tiġi ċcentrifugata għal 8 minuti f'temperatura ta' 21 °C (forza relattiva ċcentrifugali ~175 x g). Kampjun ta' 1 mL ta' supernatant huwa mħallat 1 f'5 (v/v) [i.e. 1 mL + 4 mL] ma' 30 % (w/v) SDS fl-ilma ddistillat. Id-densità ottika (OD) tat-tahlita titkejjel f'565 nm.

Il-kalkolu tal-kontenut taż-żebgħa

Il-kontenut ta' żebgħa sulforhodamine B għal kull ċirku huwa kkalkolat mill-valur ta' l-OD (5) (il-koeffiċjenti taż-żebgħa sulforhodamine B ta' 565 nm = $8,7 \times 10^4$; piż molekulari = 580). Il-kontenut taż-żebgħa huwa ddeterminat għal kull ċirku tal-gilda bl-użu ta' kurva xierqa tal-kalibrazzjoni u l-kontenut medju taż-żebgħa mbagħad jiġi kkalkolati għad-doppji.

2.

ID-DATA

Il-valuri tar-reżistenza (kΩ) u l-valuri tal-kontenut medju taż-żebgħa (µg/ċirku), fejn xieraq, għall-materjal tat-test, kif ukoll għall-kontrolli pożittivi u negattivi għandhom jiġu rrapportati f'forma ta' tabella (data individwali tal-prova u medji ± S.D.), inkluża d-data għall-esperimenti doppji/ripetuti, valuri medji u dawk individwali.



L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIZULTATI

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

Kontroll	Sustanza	Skala tar-reżistenza (kΩ)
Pożittiv	Aċidu idrokloriku 10M	0,5 – 1,0
Negattiv	Ilma ddistillat	10 – 25

Ir-rizultati medji ta' l-irbit taż-żebugħa huma aċċettati b'kundizzjoni li l-valuri konkurrenti tal-kontroll jaqgħu fl-iskali aċċettabbli għall-metodu. Skali aċċettabbli ssuġġeriti tal-kontenut taż-żebugħa għas-sustanzi tal-kontroll għall-metodoloġija u l-apparat deskritt hawn fuq jingħataw hawn isfel:

Kontroll	Sustanza	Firxa tal-kontenut taż-żebugħa (µg/ċirku)
Pożittiv	Aċidu idrokloriku 10M	40 – 100
Negattiv	Ilma ddistillat	15 – 35

Is-sustanza tat-test jitqies mhux korroziv għall-gilda:

- i) jekk il-valur medju tat-TER miksub għas-sustanza tat-test huwa akbar minn 5 kΩ, jew
- ii) il-valur medju tat-TER huwa inqas minn jew daqs 5 kΩ, u
 - iċ-ċirku tal-gilda ma juri ebda dannu ovvjju, u
 - il-kontenut medju ta' żebugħa fiċ-ċirku huwa ferm inqas mill-kontenut medju ta' žebugħa fiċ-ċirku tal-kontroll pożittiv ta' l-10M HCl miksuba fl-istess hin.

Is-sustanza tat-test titqies li hija korroziva għall-gilda:

- i) jekk il-valur medju tat-TER miksub għas-sustanza tat-test huwa inqas minn jew daqs 5 kΩ u iċ-ċirku tal-gilda huwa ovvjament iddannegġjat, jew
- ii) il-valur medju tat-TER huwa mean TER inqas minn jew daqs 5 kΩ, u
 - iċ-ċirku tal-gilda ma juri ebda dannu ovvjju, iżda
 - il-kontenut medju ta' žebugħa fiċ-ċirku huwa akbar minn jew daqs il-kontenut medju ta' žebugħa fiċ-ċirku tal-kontroll pożittiv ta' l-10M HCl miksuba fl-istess hin.

▼B**3. IR-RAPPORTAĠĠ****3.1. Ir-RAPPORTAĠĠ TAT-TEST**

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

Is-Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll:

- l-isem/ismijiet tal-Kimika bhall-isem IUPAC jew l-isem CAS u n-numru CAS, jekk magħruf;
- is-safa u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew preparazzjoni (f perċentwali skond il-piż) u n-natura fizika;
- il-karatteristiċi fiziko-kimiċi bhall-istat fiziku, pH, stabbiltà, solubbiltà fl-ilma, _ elevanti għat-twettiq ta' l-istudju;
- it-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk jgħodd (eż. tishin, thin);
- l-istabbiltà, jekk magħrufa.

L-annimali tat-test:

- varjetà u sess użati;
- l-età ta' l-annimali meta użati bħala annimali donaturi;
- l-għajn, il-kundizzjoni fejn jinżammu, dieta, eċċ.;
- id-dettalji tal-preparazzjoni tal-ġilda.

Il-Kundizzjonijiet tat-Test:

- il-kurvi tal-kalibrazzjoni għall-apparat tat-test;
- il-kurvi tal-kalibrazzjoni għat-twettiq tat-test għar-rabta taż-żebugħa;
- id-dettalji tal-proċedura tat-test użata biex jitkejjel it-TER;
- id-dettalji tal-proċedura tat-test użata għall-istima ta' l-irbit taż-żebugħa; jekk xieraq;
- deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċeduri tat-test;
- deskrizzjoni tal-kriterji ta' l-evalwazzjoni użati.

Riżultati:

- tabulazzjoni tad-data mit-TER u mill-valur ta' l-irbit taż-żebugħa (jekk xieraq) għall-annimali individwali u għal kampjuni tal-ġilda individwali;
- deskrizzjoni ta' kwalunkwe effett osservat.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konkluzjonijiet

4. REFERENZI

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).

▼B

2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.
3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.
4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *in vitro* 12, 471-482.
5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *in vitro* 12, 483-524.
6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.
8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>
9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.
11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st –2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27 ta' Marzu 2002, OECD ENV/EHS, disponibbli fuq talba mis-Segretarjat
12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

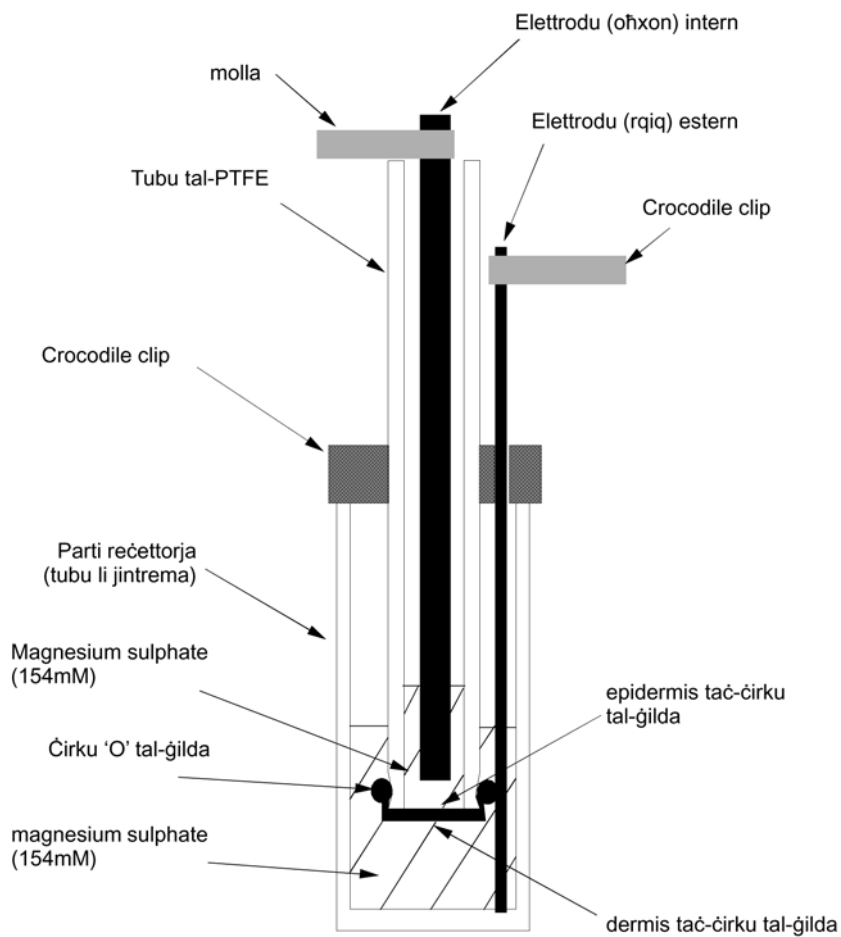
▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxic. in vitro* 6, 191-194.
14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709-720.
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 845-852.
16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An *In vitro* model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. *Toxic. in vitro.* 2, 7-17.

▼ B

Figura 1

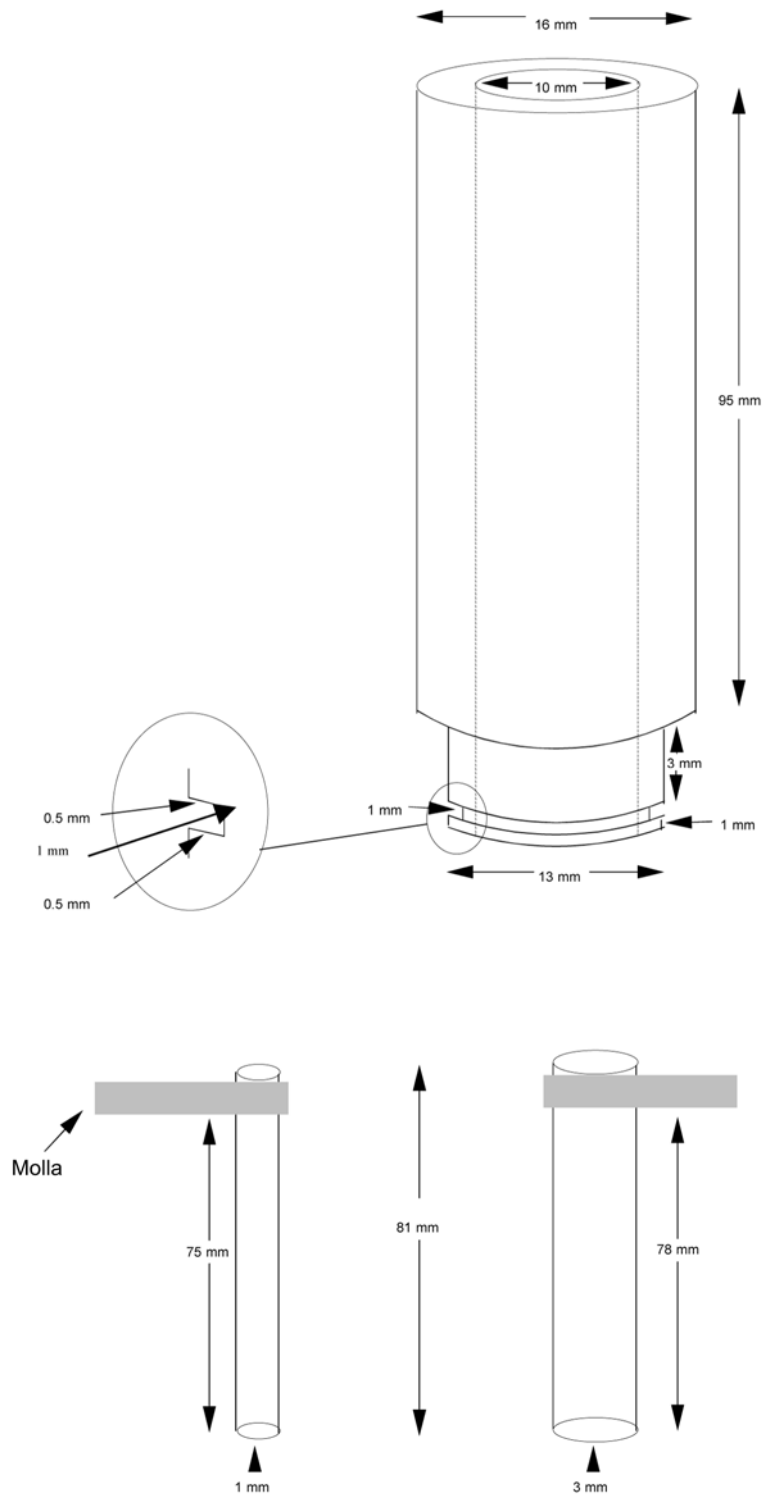
Apparat għall-figura tat-TER tal-ġilda tal-firien



▼ B

Figura 2

Dimensjonijiet tat-tubu tal-polytetrafluoroethylene (PFTE) u t-tubi reċettorji u l-elettrodi użati



▼B**Il-fatturi kritiċi ta' l-apparat muri fuq:**

- id-djamentru ġewwieni tat-tubu tal-PTFE;
- it-tul ta' l-elettrodi relattivi għat-tubu tal-PTFE u t-tubu reċettorju, b'tali mod li ċ-ċirku tal-ġilda ma jintmessx mill-elettrodi u li tul standard ta' l-elettrodu huwa f'kuntatt mat-taħlita ta' l-MgSO₄;
- l-ammont tat-taħlita ta' l-MgSO₄ fit-tubu reċettorju għandu jagħti fond ta' likwidu, relattiv għal-livell fit-tubu tal-PTFE, kif muri fil-Figura 1;
- iċ-ċirku tal-ġilda għandu jitwawwal tajjeb biżżejjed mat-tubu tal-PTFE, b'tali mod li r-reżistenza elettrika hija kejl beru tal-karatteristiċi tal-ġilda.

▼B**B.40.BIS. IL-KORROŻJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAL-MUDELL TAL-ĠILDA UMANA****1. IL-METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 431 (2004).

1.1 DAHLA

Il-korrożjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' dannu irriverribbli fit-tessut tal-ġilda wara l-applikazzjoni ta' materjal tat-test [kif definit mis-Sistema Globali Armonizzata għall-Klassifika u t-Tikkettjar ta' Sustanzi u Komposti Kimiċi (GHS – *Globally Harmonised System*)] (1). Dan il-metodu tat-test ma jehtieġx l-użu ta' annimali hajjin jew tessut ta' l-annimali għall-evalwazzjoni tal-korrożività tal-ġilda.

L-istima tal-korrożività tal-ġilda involviet tipikament l-użu ta' annimali tal-laboratorju (2). Itthassib għall-uġiġh u t-tbatija involuti f'din il-proċedura ġie indirizzat fir-reviżjoni tal-Metodu tat-Test B.4 li jippermetti d-determinazzjoni tal-korrożività tal-ġilda bl-użu ta' metodi alternattivi, *in vitro*, li jevitaw l-uġiġh u t-tbatija ta' l-annimali.

L-ewwel pass biex jiġu definiti testijiet alternattivi li jistgħu jintużaw għall-ittestjar tal-korrożività tal-ġilda kien it-twetliq ta' studji tal-validazzjoni minn qabel (3). Wara dan, studju ta' validazzjoni formali ta' metodi *in vitro* biex tiġi stmata l-korrożjoni tal-ġilda (4)(5) ġie mwettaq (6)(7)(8). Ir-riżultat ta' dawn l-istudji u letteratura oħra ppubblikata wasslu għar-rakkomandazzjoni li jistgħu jintużaw dawn it-testijiet għall-istima tal-korrożività tal-ġilda *in vivo* (10)(11)(12)(13): it-test tal-mudell tal-ġilda umana (dan il-Metodu) u t-test tar-reżistenza elettrika transkutanja (ara l-Metodu tat-Test B.40).

Studji ta' validazzjoni u studji oħrajn validati rrapportaw li t-testijiet li jużaw mudelli tal-ġilda umana (3)(4)(5)(9) jsitgħu jiddiskriminaw b'mod dipendibbli bejn il-korrożivi tal-ġilda u sustanzi mhux korrożivi fuq il-ġilda. Il-protokoll tat-test jista' wkoll jipprovdi indikazzjoni tad-distinzjoni bejn korrożivi tal-ġilda severi u daww inqas severi.

It-test deskritt f'dan il-Metodu jippermetti l-identifikazzjoni ta' sostanzi u taħlitiet kimiċi korrożivi. Jippermetti wkoll l-identifikazzjoni ta' sustanzi u taħlitiet mhux korrożivi meta tkun sostnuta mill-piż ta' determinazzjoni tal-provi bl-użu ta' informazzjoni oħra eżistenti (eż. pH, struttura-attività-relazzjonijiet, data dwar l-umani u/jew l-annimali) (1)(2)(13)(14). Normalment ma jagħtix informazzjoni xierqa dwar l-irritazzjoni tal-ġilda, u lanqas ma jippermetti s-subkategorizzazzjoni ta' sustanzi korrożivi kif permess fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (GHS) (1).

Għal evalwazzjoni shiha ta' l-effetti lokali fuq il-ġilda wara espożizzjoni dermali unika, huwa rakkomandat li tiġi segwita l-istrateġija tat-test sekwenzjali kif meħmuża mal-Metodu tat-Test B.4 (2) u providuta fis-Sistema tal-Klassifika Globali Armonizzata (GHS) (1). Din l-istrateġija tat-test tinkludi t-twetliq ta' testijiet *in vitro* għall-korrożjoni tal-ġilda (kif deskritt f'dan il-metodu) u l-irritazzjoni tal-ġilda qabel ma jitqies l-ittestjar fl-annimali hajjin.

▼B

1.2

DEFINIZZJONIJIET

Il-Korrożjoni tal-ġilda *in vivo*: hija l-produzzjoni ta' dannu irri-versibbli tal-ġilda: jiġifieri nekrozi viżibbli mill-epidermis u ġewwa d-dermis, wara l-applikazzjoni ta' sustanza tat-test għal mhux aktar minn erba' sigħat. Ir-reazzjonijiet korrożivi huma tipifikati minn ulċeri, ħruġ ta' demm, qxur bid-demm, u sa l-aħħar ta' l-osservazzjoni ta' 14-il jum, tnaqqis ta' kulur minhabba li tibjad il-ġilda, żoni shah ta' alopecia, u ċikatriċi. Il-histopatoloġija għandha titqies biex jiġu evalwati leżjonijiet li dwarhom hemm dubju.

Il-vijabilità taċ-ċelloli: parametru li jkejjel l-attività totali ta' popolazzjoni ta' ċelloli (eż. l-abilità ta' mitochondrial dehidrogenases ċellolari li jnaqqsu ż-żebgħa vitali MTT), li, skond il-punt tat-tmiem imkejjel u d-diżinn tat-test użat, tikkorrelata ma' l-għadd totali u/jew il-vitalità taċ-ċelloli.

1.3

IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA

Tabella 1

Il-Kimiċi ta' Riferenza

Isem	Nru EINECS	Nru CAS	
1,2-Diaminopropane	201-155-9	78-90-0	Korrożiv Hafna
Aċidu Akriliku	201-177-9	79-10-7	Korrożiv Hafna
2-tert. Butylphenol	201-807-2	88-18-6	Korrożiv
Potassium hydroxide (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrożiv
Aċidu sulfuriku (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrożiv
Aċidu Oktanoiku (aċidu kapriliku)	204-677-5	124-07-02	Korrożiv
4-Amino-1,2,4-triazole	209-533-5	584-13-4	Mhux Korrożiv
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Mhux Korrożiv
Phenethyl bromide	203-130-8	103-63-9	Mhux Korrożiv
Tetrachloroethylene	204-825-9	27-18-4	Mhux Korrożiv
Aċidu izosteariku	250-178-0	30399-84-9	Mhux Korrożiv
4-(Methylthio)-benzaldehyde	222-365-7	3446-89-7	Mhux Korrożiv

Il-parti l-kbira tal-kimiċi elenkati huma meħuda mil-lista ta' kimiċi magħzula għall-istudju internazzjonali ta' validazzjoni ECVAM (4). L-għażla tagħhom hija bbażata fuq dawn il-kriterji li ġejjin:

- (i) numru indaqs ta' sustanzi korrożivi u mhux korrożivi;
- (ii) sustanzi disponibbli kummerċjalment li jkopru l-parti l-kbira tal-klassijiet ta' kimiċi rilevanti;
- (iii) l-inkluzjoni ta' sustanzi korrożivi hafna kif ukoll daww inqas korrożivi sabiex tkun possibbli d-diskriminazzjoni bbażata fuq il-potenza korrożiva;

▼B

- (iv) l-ghażla tal-kimiċi li jistgħu jiġu mmanigġjati f'laboratorju mingħajr azzard serju minbarra l-korrożività.

IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-materjal tat-test huwa applikat topikament fuq mudell ta' ġilda umana tri-dimensjonali li fih għall-inqas epidermis rikostitwut bi *stratum corneum* funzjonali. Il-materjali korriżivi huma identifikati mill-abilità tagħhom li jipproduċu tnaqqis fil-vijabbiltà ta' ċelloli [kif iddeterminat, per eżempju, bl-użu tal-figura tat-tnaqqis ta' l-MTT (15)] 'l isfel minn livell ta' limitu definiti matul perjodi speċifikati ta' espożizzjoni. Il-prinċipju tal-figura tal-mudell tal-ġilda umana hija bbażata fuq il-bażi ta' l-ipoteżi li l-kimiċi korrożivi jistgħu jippenetraw l-*istratum corneum* bid-diffużjoni jew l-erożjoni, u huma ċitotossiċi fuq is-saffi ta' ċelloli ta' taht.

Proċedura*Il-Mudelli tal-ġilda umana*

Il-Mudelli tal-ġilda umana jistgħu jinbnew jew jinkisbu kummerċjalment (eż. il-mudelli EpiDermTM u EPISKINTM) (16)(17)(18)(19) jew jistgħu jiġu żviluppati jew mibnija fil-laboratorju tat-test (20)(21). Huwa rikonoxxut li l-użu tal-ġilda umana huwa soġġett għal kunsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali. Kwalunkwe mudell ġdid għandu jiġi vvalidat (għall-inqas sal-grad deskritt taht 1.4.1.1.2). Il-Mudelli tal-ġilda umana użati għal dan it-test għandhom ikunu konformi ma' dawn li ġejjin:

1.4.1.1.1 Il-Kundizzjonijiet tal-Mudelli Ġenerali:

Għandhom jintużaw keratinocytes umani biex jinbena l-*epithelium*. Għandhom ikunu preżenti bosta saffi ta' ċelloli epiteljali vjabbli taht *stratum corneum* funzjonali. Il-mudell tal-ġilda jista' wkoll ikollu saff ta' komponenti stromali. L-*istratum corneum* għandu jkollu bosta saffi bil-profil mehtieg ta' lipidi biex jipproduċi barr-jera funzjonali bir-robustezza biex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida tal-li jimmarrkaw ċitotossiċi. Il-karatteristiċi tal-konteniment tal-mudell għandhom jipprevjenu l-passaġġ tal-materjal madwar l-*istratum corneum* fit-tessut vjabbli. Il-mogħdija tal-kimiċi tat-test madwar l-*istratum corneum* twassal għall-immudellar fqir ta' l-espożizzjoni għall-ġilda. Il-mudell tal-ġilda għandu jkun hieles mill-kontaminazzjoni bil-batterji (inkluż mikoplazma) jew fungi.

1.4.1.1.2 Il-Kundizzjonijiet tal-Mudelli Funzjonali:

Id-daqs tal-vijabbiltà normalment hija kkwantifikata bl-użu ta' MTT jew iż-żebghat vitali oħrajn ikkonvertiti metabolikament. F'dawn il-każijiet id-densità ottika (OD – *optical density*) taż-żebgha estratta (solubilizzata) mit-tessut tal-kontroll negattiv għandha tkun għall-inqas 20 drabi akbar mill-OD tas-solvent ta' l-estrazzjoni wahdu [għal perspettiva ġenerali ara (22)]. It-tessut tal-kontroll negattiv għandu jkun stabbli fil-kultura (jipprovdi kejl simili ta' vijabbiltà) għal kemm idum il-perjodu ta' l-espożizzjoni tat-test. L-*istratum corneum* għandu jkun robust biżżejjed biex tirreżisti l-penetrazzjoni mghagħla ta' xi kimiċi li jimmarrkaw ċitotossiċi (eż. 1 % Triton X-100). Din il-karatteristika tista' tiġi stmata bil-hin ta' l-espożizzjoni mehtieg biex il-vijabbiltà ta' ċelloli tonqos b'50 % (ET₅₀) (eż. għall-mudelli EpiDermTM u EPISKINTM dan huwa > sagħtejn). It-tessut għandu juri r-reproduttività maż-żmien u preferibbilment bejn il-laboratorji. Barra minn dan għandhom ikunu jistgħu jipprevedu l-potenzjal korroziv tal-kimiċi ta' riferenza (ara t-Tabella 1) meta użati fil-protokoll tat-test magħżul.

▼ B*L-applikazzjoni tat-test u s-sustanzi tal-kontroll*

Żewġ replikati tat-tessut jintużaw għal kull trattament (hin ta' l-espożizzjoni), inklużi l-kontrolli. Għall-materjali likwidi, għandha tkun applikata biżżejjed sustanza tat-test biex tkopri l-wiċċ tat-test b'mod uniformi: għadu jintuża mhux inqas minn 25 µL/cm². Għall-materjali solidi, għandha tiġi applikata biżżejjed sustanza tat-test biex tkopri l-ġilda b'mod indaq, u għandha tiġi umdata b'ilma deonizzat jew distillat biex jiġi żgurat kuntatt tajjeb mal-ġilda. Fejn xieraq, is-solidi għandhom jiġu mithuna għal terra qabel l-applikazzjoni. Il-metodu ta' l-applikazzjoni għandu jkun xieraq għas-sustanza tat-test (ara eż. r-referenza 5). Fl-aħhar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, il-materjal tat-test għandu jiġi mahsul bir-reqqa mill-wiċċ tal-ġilda b'*buffer* xieraq, jew 0,9 % NaCl.

Għandhom jintużaw kontrolli konkurrenti pożittivi u negattivi għal kull studju biex tiġi żgurata l-hidma xierqa tal-mudell esperimentali. Is-sustanzi tal-kontroll ppożittivi sugġeriti huma l-aċidu aċetiku glaċjali jew 8N KOH. Il-kontrolli negattivi sugġeriti huma 0,9 % NaCl jew ilma.

Il-kejl tal-vijabbiltà taċ-ċelloli

Jistgħu jintużaw biss mudelli kwantitattivi, validati biex titkejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli. Barra minn dan, il-miżura tal-vijabbiltà għandha tkun kompatibbli ma' l-użu f'kostruzzjoni ta' tessut tri-dimensjonali. L-irbit taż-żebugħa mhux speċifiku m'għandux jinterferixxi mal-kejl tal-vijabbiltà. Iż-żebugħa ta' l-irbit tal-proteini u dawk li ma jgħaddux minn konverżjoni metabolika (eż. l-aħmar newtrali) għalhekk mhumiex xierqa. Il-figura li tintuża l-aktar spiss hija t-tnaqqis MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl blue; EINECS numru 206-069-5, CAS numru 298-93-1]), li ntweri li jagħti riżultati preċiżi u riproducibbli (5) iżda jistgħu jintużaw ohrajn. Il-kampjun tal-ġilda jitqiegħed f'tahlita ta' MTT ta' konċentrazzjoni (eż. 0,3-1 mg/mL) f'temperatura ta' inkubazzjoni xierqa għal 3 sigħat. Il-prodott blu preċipitat ta' formazan imbagħad huwa estratt bl-użu ta' solvent (isopropanol), u l-konċentrazzjoni tal-formazan hija mkejla b'determinazzjoni ta' l-OD f'*wavelength* bejn 540 u 595 nm.

L-azzjoni kimika bil-materjal tat-test fuq iż-żebugħa vitali tista' timita dik tal-metabolizmu ċellolari li jwassal għal stima falza tal-vijabbiltà. Dan intwera li jsir meta dan il-materjal tat-test mhuwiex imneħhi għal kollox mill-ġilda bit-tlahliħ (9). Jekk il-materjal tat-test jagħxi direttament fuq iż-żebugħa vitali, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali biex issir skoperta u korrezzjoni għall-interferenza tas-sustanzi tat-test mal-kejl tal-vijabbiltà (9)(23).

2.

DATA

Għal kull tessut, il-valuri OD u d-data dwar il-perċentwali kkalkolati tal-vijabbiltà taċ-ċelloli għall-materjal tat-test, il-kontrolli pożittivi u dawk negattivi għandhom ikunu rrapportati f'tabella, inkluża d-data minn esperimenti ripetuti tar-repliċi kif xieraq, valuri medji u individwali.



L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIZULTATI

Il-valuri ta' l-OD miksuba għal kull kampjun tat-test jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-perċentwal tal-vijabbiltà relattiva għall-kontroll negattiv, li hija stabbilita arbitrarjament bħala 100 %. Il-limitu tal-perċentwal tal-vijabbiltà taċ-ċelloli li jiddistingwi l-materjali tat-test korrożivi u dawk mhux korrożivi (jew li jiddiskriminaw bejn il-klassijiet differenti, korrożivi), jew il-proċedura/i statistikali għall-evalwazzjoni tar-risultati u l-identifikazzjoni tal-materjali korrożivi, għandhom jiġu definiti b'mod ċar u ddokumentati, u għandhom jintwerew li huma xierqa. B'mod ġenerali dawn il-valuri limiti huma stabbiliti waqt l-ottimizzazzjoni tat-test, ittestjati waqt fażi ta' validazzjoni qabel, u kkonfermati fi studju ta' validazzjoni. Bħala eżempju, it-tbassir tal-Korrożività assoċjata mal-mudell EpiDermTM huwa (9):

Is-sustanza tat-test titqies li hija korrożiva għall-ġilda:

- (i) jekk il-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' 3 minuti hija inqas minn 50 %, jew
- (ii) jekk il-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' 3 minuti hija akbar minn jew daqs 50 % u l-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' siegħa hija inqas minn 15 %.

Is-sustanza tat-test titqies li hija mhux korrożiva għall-ġilda:

- (i) jekk il-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' 3 minuti hija akbar minn jew daqs 50 % u l-vijabbiltà wara espożizzjoni ta' siegħa hija akbar minn jew daqs 15 %.

3. IR-RAPPORTAĠĠ

3.1. IR-RAPPORTAĠĠ TAT-TEST

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

Is-Sustanzi tat-Test u tal-Kontroll:

- l-isem/ismijiet tal-Kimika bħall-isem IUPAC jew l-isem CAS u l-CAS numru, jekk magħruf;
- is-safa u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew preparazzjoni (f'perċentwali skond il-piż);
- il-karatteristiċi fiżiko-kimiċi bħall-istat fiżiku, pH, stabbiltà, solubbiltà fl-ilma, rilevanti għat-twettiq ta' l-istudju;
- it-trattament tas-sustanzi tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk jgħodd (eż. tishin, thin);
- l-istabbiltà, jekk magħrufa;

Il-ġustifikazzjoni tal-mudell tal-ġilda u l-protokoll użati.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

- is-sistema taċ-ċelloli użata;
- l-informazzjoni tal-kalibrazzjoni għall-apparat tal-kejl użat biex titkejjel il-vijabbiltà taċ-ċelloli (eż. Spettrofotometru);

▼B

- informazzjoni shiha ta' appoġġ għall-mudell speċifiku tal-ġilda użata inkluż il-validità tagħha;
- id-dettalji tal-proċedura tat-test użata;
- id-dożi tat-test użati;
- deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċeduri tat-test;
- referenza għad-data storika tal-mudell;
- deskrizzjoni tal-kriterji ta' l-evalwazzjoni użati.

Riżultati:

- tabulazzjoni tad-data mill-kampjuni individwali tat-test;
- deskrizzjoni ta' kwalunkwe effett osservat.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konkluzjoni.

4. **REFERENZI**

1. OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).
2. Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion.
3. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Poncet, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23,219-255.
4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. *In vitro* 12, 471-482.
5. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzthutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. *In vitro* 12, 483-524.
6. OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
7. Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.
8. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.-niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp.371-401.
10. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
11. ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.
12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In vitro* test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.
13. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st –2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, disponibbli fuq talba mis-Segretarjat
14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.
15. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.
16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. *In vitro* 8, 889-891.
17. Ponc, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.
18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis *in vitro*. In *In vitro* Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140
19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). *In vitro* and post –transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319
20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.
21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* 5, 69-84.
23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxic. InVitro* 15, 57-93.

▼B

B.41. IT-TEST TAL-FOTOTOSSICITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU

1. METODU

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għall-OECD TG 432 (2004).

1.1. DAHLA

Il-fototossicità hija definita bħala reazzjoni tossika minn sustanza applikata fuq il-ġisem li hija miġbuda jew miżjuda (apparenti f'livelli ta' dożi aktar baxxi) wara l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew li hija indotta mill-irradjazzjoni tal-ġilda wara amministrazzjoni sistemika ta' sustanza.

It-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU jintuża biex jiġi identifikat il-potenzjal fototossiku ta' sustanza tat-test indotta mill-kimika eċċitata wara l-espożizzjoni għad-dawl. It-test jevalwa l-foto-ċitotossicità bit-tnaqqis relattiv fil-vijabbiltà taċ-ċelloli esposti għall-kimika fil-preżenza kontra n-nuqqas tad-dawl. Is-sustanzi identifikati minn dan it-test x'aktarx ikunu fototossiċi *in vivo* wara applikazzjoni sistemika u tixrid mal-ġilda, jew wara applikazzjoni topikali.

Bosta tipi ta' kimiċi ġew irrapportati li jinduċu l-effetti fototossiċi (1)(2)(3)(4). Il-karatteristika komuni tagħhom hija l-abilità tagħhom li jassorbu l-enerġija tad-dawl fil-firxa tad-dawl tax-xemx. Skond l-ewwel liġi tal-fotokimika (il-Liġi ta' Grotthaus-Draper), il-fotoreazzjoni tehtieg assorbiment suffiċjenti ta' ammonti ta' dawl. Għalhekk qabel ma jitqies l-ittestjar bioloġiku, spettru ta' l-assorbiment UV/vis tal-kimika tat-test għandu jiġi ddeterminat skond il-Linja Gwida tat-Test 101 ta' l-OECD. Ġie ssuġġerit li jekk il-koeffiċjent ta' l-estinzjoni/assorbiment molari huwa inqas minn 10 litru x mol⁻¹ x cm⁻¹ x'aktarx li l-kimika mhijiex fotoreattiva. Din il-kimika tista' ma tehtiegx li tiġi ttestjata fit-test *in vitro* 3T3 NRU tal-fototossicità jew kwalunkwe test ieħor bioloġiku għall-effetti avversi fotokimiċi (1)(5). Ara wkoll l-Anness 1.

L-affidabbiltà u r-rilevanza tat-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU ġew evalwati dan laħhar (6)(7)(8) (9). It-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU intwera li jbassar l-effetti ta' fototossicità akuta fl-annimali u fl-umani *in vivo*. It-test mhuwiex dizinjat li jbassar effetti avversi oħrajn li jistghu jirriżultaw minn azzjoni kkombinata ta' kimika u d-dawl, eż. ma jindirizzax il-fotoġenotossicità, il-fotoallergija, jew il-fotokarċinoġenicità, u lanqas ma jippermetti stima tas-saħħa tal-fototossicità. Barra minn dan, it-test ma ġiex dizinjat li jindirizza l-mekkaniżmi indiretti tal-fototossicità, l-effetti tal-metaboliti tas-sustanza tat-test, jew l-effetti tat-tahlitiet.

Billi l-użu tas-sistemi metabolizzanti huwa rekwizit ġenerali għat-testijiet kollha *in vitro* għall-basra ta' potenzjal ġenotossiku jew karċinoġeniku, s'issa, fil-każ tal-fototossikoloġija, hemm biss eżempji rari fejn it-trasformazzjoni metabolika hija mehtiega biex il-kimika taġixxi bħala fototissinu *in vivo* jew *in vitro*. Għalhekk, la jitqies mehtieg u lanqas xjentifikament ġustifikat li dan it-test isir b'sistema ta' attivazzjoni metabolika.

▼B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Irradjanza: fl-intensità ta' incident tad-dawl ultravjola (UV) jew ta' dawl vizibbli fuq wiċċ, imkejjet f' W/m^2 or mW/cm^2 .

Doża ta' dawl: il-kwantità (= intensità $\times$ ħin) ta' radjazzjoni ultravjola (UV) jew vizibbli fuq wiċċ, espresso f'Joules (= $W \times s$) għal kull arja tal-wiċċ, eż. J/m^2 jew J/cm^2 .

Wavebands tad-Dawl UV: l-indikazzjonijiet rakkomandati mis-CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) huma: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) u UVC (100-280 nm). Indikazzjonijiet oħrajn jintużaw ukoll; id-diviżjoni bejn UVB u UVA spiss titqiegħed bħala 320 nm, u l-UVA tista' tinqasam f'UV-A1 u UV-A2 u jsir qsim f'madwar 340 nm.

Il-vijabilità taċ-ċelloli: parametru li jkejjel l-attività totali ta' popolazzjoni ta' ċelloli (eż. l-użu taż-żebħa vitali Ahmar Newtrali fil-lizożomi ċellulari), li, skond il-punt tat-tmiem imkejjet u d-diżinn tat-test użat, tikkorrelata ma' l-ghadd totali u/jew il-vitalità taċ-ċelloli.

Il-vijabilità taċ-ċelloli relattiva: il-vijabilità taċ-ċelloli espressa b'relazzjoni mal-kontrolli solventi (negattivi) li ntużaw fil-proċedura shiħa tat-test (jew +Irr jew -Irr) izda mhux ittrattati bil-kimika tat-test.

PIF (Photo-Irritation-Factor – Fattur tal-Foto-Irritazzjoni): fattur iġġenerat bit-tqabbil ta' żewġ konċentrazzjonijiet effettivi ndaqs (IC_{50}) tal-kimika tat-test miksuba fin-nuqqas (-Irr) u fil-preżenza (+Irr) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika b'dawl UVA/vis.

IC_{50} : il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test li biha l-vijabilità taċ-ċelloli tinnaqqas b'50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect – Foto-Effett-Medju): kejl derivat mill-analiżi matematika tal-kurvi tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni miksuba fin-nuqqas (-Irr) u fil-preżenza (+Irr) ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika bid-dawk UVA/vis.

Fototossicità: reazzjoni tossika akuta li hija elicitata wara l-ewwel espożizzjoni tal-ġilda ma' xi kimika u l-espożizzjoni sussegwenti għad-dawl, jew li hija indotta b'mod simili mill-irradjazzjoni tal-ġilda wara l-amministrazzjoni sistemika ta' kimika.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU huwa bbażat fuq paragun taċ-ċitotossicità ta' kimika meta tiġi ttestjata fil-preżenza u fin-nuqqas ta' espożizzjoni għal doża mhux ċitotossika ta' dawl tax-xemx simulata. Iċ-ċitotossicità f'dan it-test hija espressa bħal tnaqqis dipendenti fuq il-konċentrazzjoni ta' l-użu taż-żebħa vitali Ahmar Newtrali meta mkejjet 24 siegħa wara t-trattament bil-kimika tat-test u l-irradjazzjoni (10). L-Ahmar Newtrali huwa żebħa katjonika dghajfa li tippenetra t-tessut taċ-ċelloli malajr bin-nuqqas ta' diffiżjoni, u takkumula b'mod interċellulari fil-lizożomi. L-alterazzjonijiet tal-wiċċ tat-tessut sensitiv lizożomali jwasslu għall-fragilità lizożomali u tibdil iehor li gradwalment isiru irriversibbli. Dan it-tibdil ikkaġunat mill-azzjoni tax-xenobjotiċi jirrizulta f'użu u rbit mnaqqsa ta' l-Ahmar Newtrali. Għalhekk huwa possibbli li ssir distinzjoni bejn iċ-ċelloli vijabbli, dawk dannegġjati u dawk mejtin, li huwa l-bażi ta' dan it-test.

▼B

Iċ-ċelloli Balb/c 3T3 jinżammu f'kultura għal 24 siegħa għall-formazzjoni ta' monosaffi. Imbagħad żewġ plattini 96-well għal kull kimika tat-test jiġi pre-inkubati bi tmien konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test għal siegħa. Wara dan, waħda miż-żewġ plattini hija esposta għall-oghla doża ta' irradjazzjoni mhux ċitotossika filwaqt li l-plattina l-oħra tinzamm fid-dlam. Fiz-żewġ plattini il-mezz tat-trattament huwa sostitwit mill-mezz tal-kultura u wara 24 siegħa oħra ta' inkubazzjoni, il-vijabilità taċ-ċelloli hija ddeterminata bl-użu ta' l-Aħmar Newtrali. Il-vijabilità taċ-ċelloli hija espressa bħala persentaġġ tal-kontrolli tas-solvent mhux ittrattati u hija kkalkolata għal kull konċentrazzjoni tat-test. Biex jitbassar il-potenzjal fototossiku, ir-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni huma mqabbla, normalment fil-livell ta' l-IC₅₀, jiġifieri l-konċentrazzjoni li tnaqqas il-vijabilità taċ-ċelloli għal 50 % meta mqabbel mal-kontrolli mhux ittrattati.

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 Il-preparazzjonijiet

1.4.1.1. *Iċ-ċelloli*

Linja permanenti tal-fibroblast taċ-ċelloli tal-ġrieden, Balb/c 3T3, klonu 31, jew mill-American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, Stati Uniti, jew mill-European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Renju Unit, intuzat fl-istudju tal-validazzjoni, u għalhekk huwa rakkomandat il-ksib minn depożitarju taċ-ċelloli kkwalifikat sew. Ċelloli jew linji taċ-ċelloli oħrajn jistgħu jintużaw bl-istess proċedura tat-test jekk il-kundizzjonijiet tal-kultura huma adattati għall-bżonnijiet speċifiċi taċ-ċelloli, iżda l-ekwivalenza għandha tintwera.

Iċ-ċelloli għandhom jiġu ċekkjati b'mod regolari għan-nuqqas tal-kontaminazzjoni tal-mikoplażma u jintużaw biss jekk ma tinstabx kontaminazzjoni (11).

Huwa importanti li s-sensittività għall-UV taċ-ċelloli hija vverifikata b'mod regolari skond il-proċedura tal-kontroll tal-kwalità deskritta f'dan il-metodu. Minhabba li s-sensittività taċ-ċelloli għall-UVA tista' tizdied bin-numru ta' passaġġi, għandhom jintużaw ċelloli Balb/c 3T3 tan-numru l-aktar baxx ta' passaġġi possibbli li jista' jinkiseb, preferibbilment inqas minn 100 (ara t-taqsimi 1.4.2.2.2 u l-Anness 2).

1.4.1.2. *Il-kundizzjonijiet tal-mezzi u tal-kultura*

Għandhom jintużaw mezzi tal-kultura u kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni xierqa għall-passaġġ rutin taċ-ċelloli u matul il-proċedura tat-test, eż. għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 dawn huma DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplimentati b'10 % seru ta' l-ghogol għadu jitwield, 4 mM glutamina, penicillina (100 IU), u streptomycin (100 µg/mL), u inkubazzjoni umidifikata f'temperatura ta' 37 °C, 5-7,5 % CO₂ skond il-buffer (ara t-taqsimi 1.4.1.4, tieni paragrafu.). Huwa ta' importanza partikolari li l-kundizzjonijiet tal-kultura taċ-ċelloli jiżguraw hin taċ-ċiklu taċ-ċelloli fil-firxa normali storika taċ-ċelloli jew tal-linja taċ-ċelloli użati.

1.4.1.3. *Il-preparazzjoni tal-kulturi*

Iċ-ċelloli minn kulturi ta' hażniet iffriżati huma miżrugħa f'mezz tal-kultura ta' densità approssimata u subkulturati għall-inqas darba qabel ma jintużaw fit-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU.

▼B

Iċ-ċelloli użati għat-test tal-fototossicità jinzerghu fid-densità xierqa sabiex il-kulturi ma jilhqx konfluwenza sa l-ahhar tat-test, jiġifieri meta l-vijabilità hija ddeterminata 48 siegħa wara ż-żriegħ taċ-ċelloli. Għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 imkabbra f' plattini 96-well, id-densità rrakkomandata taż-żriegħ taċ-ċelloli hija ta' 1×10^4 ċelloli għal kull well.

Għal kull test iċ-ċelloli kimiċi jiġu miżrugħa b'mod identiku f'żewġ plattini separati 96-well, li mbagħad jitgħaddew b'mod konkorrenti mill-proċedura shiha tat-test taht kundizzjonijiet ta' kultura identitici hlief għat-terminu shih meta wahda mill-plattini tiġi irradjata (+Irr) u l-oħra tinzamm fid-dlam (-Irr).

1.4.1.4. *Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test*

Is-sustanzi tat-test għandhom jiġu ppreparati friski, immedjatament qabel l-użu kemm-il darba d-data ma turix l-istabilità tagħhom meta huma mażżuna. Huwa rrakkomandat li l-immaniġġjar kimiku kollu u t-trattament inizzjali taċ-ċelloli jsiru taht kundizzjonijiet tad-dawl li jevitaw il-fotoattivazzjoni jew id-degradazzjoni tas-sustanza tat-test qabel l-irradjazzjoni.

Il-kimiċi tat-test għandhom jinħallu f'tahlitiet ta' mluħ *buffered*, eż. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), jew tahlitiet *buffer* oħrajn fiżjoloġikament ibbilanċjati, li għandhom ikunu ħelsin minn komponenti ta' proteini, komponenti li jassorbu d-dawl (eż. kuluri li jindikaw il-pH u vitamini) sabiex tiġi evitata l-interferenza matul l-irradjazzjoni. Ladarba matul l-irradjazzjoni ċ-ċelloli jinżammu għal madwar 50 minuta barra mill-inkubatur ta' CO₂, għandu jkun hemm attenzjoni li tiġi evitata l-alkalizzazzjoni. Jekk jintużaw *buffers* dgħajfin bħall-EBSS dan jista' jinkiseb billi ċ-ċelloli jiġu inkubati f'7,5 % CO₂. Jekk iċ-ċelloli jiġu inkubati f'5 % CO₂ biss, għandu jingħazzel *buffer* aktar qawwi.

Il-kimiċi tat-test ta' solubbiltà limitata fl-ilma għandhom jinħallu f'solvent xieraq. Jekk jintuża solvent, dan għandu jkun preżenti f'volum kostanti fil-kulturi kollha, jiġifieri fil-kontrolli negattivi (solventi) kif ukoll fil-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test, u għandhom ikunu mhux ċitotossici f'dik il-konċentrazzjoni. Il-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test għandhom jingħazlu sabiex jiġu evitati tahlitiet preċipitati jew imsahħhin.

Dimethylsulphoxide (DMSO) u l-etanol (ETOH) huma s-solventi rrakkomandati. Jistgħu jkunu xierqa solventi oħrajn ta' ċitotossicità baxxa. Qabel ma jintużaw, is-solventi kollha għandhom jiġu stmati għal karatteristiċi xierqa, eż. reazzjoni mal-kimika tat-test, tnaqqis ta' l-effett fototossiku, proprjetajiet *scavenging* radikali u/jew stabbiltà kimika fis-solvent.

It-tahlit fil-vortiċi u/jew is-sonikazzjoni u/jew it-tishin sa temperatura xierqa jistgħu jintużaw biex tiġu mghejuna s-solubilazzjoni kemm-il darba dan ma jaffettwax l-istabilità tal-kimika tat-test.

▼B

1.4.1.5. *Il-Kundizzjonijiet ta' l-Irradjazzjoni*1.4.1.5.1. *L-ghajjn tad-dawl*

L-ghazla ta' ghajjn xieraq u ta' filtri tad-dawl huwa fattur kruċjali fl-ittestjar tal-fototossicità. Id-dawl ta' l-UVA u tar-reġjuni vizibbli normalment huwa normalment assoċjat mar-reazzjonijiet fototossiċi *in vivo* (3)(12), filwaqt li generalment il-UVB huwa inqas rilevanti iżda huwa ċitotossiku hafna; iċ-ċitotossicità tizdied 1 000-darba għaliex il-*wavelength* jinbidel minn 313 għal 280 nm (13). Il-kriterji għall-ghazla ta' l-ghajjn tad-dawl xieraq għandhom jinkluzu r-rekwiżit li l-ghajd tad-dawl jagħti *wavelengths* assorbiti mill-kimika tat-test (spettru ta' l-assorbiment) u li d-doża tad-dawl (li tista' tinkiseb f'hin ta' espożizzjoni raġonevoli) għandha tkun suffiċjenti biex jinżammu l-kimiċi magħrufin li huma fotoċitotossiċi. Barra minn dan, il-*wavelengths* u d-doži m'għandhomx ikunu ta' hsara żejda għas-sistema tat-test, eż. l-emissjoni tas-shana (ir-reġjun ta' l-infra-ahmar).

Is-simulazzjoni tad-dawl tax-xemx bis-simulaturi tax-xemx titqies li hija l-ghajjn ta' dawl artifiċjali ottimali. Id-distribuzzjoni ta' l-enerġija ta' l-irradjazzjoni tas-simulatur tax-xemx iffiltrat għandha tkun qrib dik tad-dawl tal-ġurnata barra mogħtija f'(14). Kemm l-arki ta' Xenon u arki ta' alid ta' merkurju-metall (*doped*) jintużaw bħala simulaturi tax-xemx (15). Ta' l-ahħar għandu l-vantaġġ li jagħti inqas shana u huwa irhas, iżda kemm jaqbel mad-dawl tax-xemx huwa inqas perfett meta mqabbel ma' dak ta' l-arki tax-xenon. Minhabba li s-simulaturi kollha tax-xemx jagħtu kwantitajiet ta' UVB sinjifikanti għandhom ikunu ffiltrati biex inaqqsu l-*wavelengths* ta l-UVB li huma ċitotossiċi hafna. Minhabba li l-materjali tal-plastik tal-kultura taċ-ċelloli fihom stabbilizzanti tal-UV l-ispettru għandu jiġi mkejjebl bl-istess tip ta' għatu tal-plattina ta' 96-well li se jintuża fl-analiżi. Irrispettivament mill-miżuri mehuda biex partijiet mill-ispettru jiġu mnaqqsa bl-iffiltrar jew b'effetti inevitabbli ta' filtru tat-tagħmir, l-ispettru rrekordjat 'l isfel minn dawn il-filtri m'għandhomx jiddevjaw mid-dawl tal-ġurnata barra standardizzati (14). Eżempju tad-distribuzzjoni ta' l-irradjanza spettrali tas-simulatur tax-xemx iffiltrat użat fl-istudju tal-validazzjoni tat-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU jingħata f'(8)(16). Ara wkoll l-Anness 2 Figura 1.

1.4.1.5.2 *Id-Dożimetrija*

L-intensità tad-dawl (irradjanza) għandha tiġi ċekkjata b'mod regolari qabel kull test tal-fototossicità bl-użu ta' miter ta' l-UV xieraq tal-broadband. L-intensità għandha titkejjel bl-istess tip ta' għatu tal-plattina ta' 96-well li se jintuża fl-analiżi. Il-miter ta' l-UV għandu jkun ġie kkalibrat għall-ghajjn. Il-hidma tal-miter ta' l-UV għandha tiġi ċekkjata, u għal dan l-ghan l-użu ta' miter ta' l-UV ieħor, ta' riferenza, ta' l-istess tip u ta' kalibrazzjoni identika huwa rrakkomandat. Idealment, f'intervalli akbar, għandu jintuża spettroadijometru biex titkejjel l-irradjanza spettrali ta' l-ghajjn tad-dawl iffiltrat u biex tiġi ċekkjata l-kalibrazzjoni tal-miter ta' l-UV tal-broadband.

Doża ta' 5 J/cm² (kif imkejjebl fil-firxa ta' l-UVA) giet determinata li mhijjex ċitotossika għaċ-ċelloli Balb/c 3T3 u li hija qawwija biżżejjet biex teċċita lill-kimiċi biex jeliċitaw reazzjonijiet fototossiċi, (6) (17) eż. biex jinkiseb 5 J/cm² f'perjodu ta' żmien ta' 50 min, l-irradjanza giet aġġustata għal 1,7 mW/cm². Ara l-Anness 2 Figura 2. Jekk tintuża linja oħra ta' ċelloli jew ghajjn ta' dawl differenti, id-doża ta' l-irradjazzjoni tista' tkun trid tiġi kkalibrata sabiex jista' jingħazel reġimen tad-doża li ma jagħmilx hsara liċ-ċelloli iżda li hija biżżejjed biex teċċita fototossini standard. Il-hin ta' l-espożizzjoni għad-dawk huwa kkalkolat b'dan il-mod:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Doża ta' irradjazzjoni (J /cm}^2) \times 1000}{\text{irradjanza (mW /cm}^2) \times 60} \quad (1J = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2 **Il-kundizzjonijiet tat-test**1.4.2.1 *Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test*

Il-firxiet tal-konċentrazzjonijiet ta' kimika ttestjata fil-preżenza (+Irr) u fin-nuqqas (-Irr) tad-dawl għandhom jiġu ddeterminati b'mod xieraq f'analizzjiet tas-sejba tal-firxa tad-dożi. Jista' jkun utli li s-solubbiltà tiġi smtata fil-bidu u fis-60 min (jew kwalunkwe hin ta' trattament huwa mehtieg), għaliex is-solubbiltà tista' tinbidel maż-żmien jew matul l-espożizzjoni. Biex tiġi evitata t-tossicità indotta minn kundizzjonijiet ta' kultura mhux xierqa jew minn kimiċi ta' aċidità jew alkalinità għolja, il-pH tal-kulturi taċ-ċelloli biż-żjieda tal-kimika tat-test għandu jkun fil-firxa 6,5 – 7,8.

L-oghla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun ġewwa l-kundizzjonijiet fiżjoloġiċi tat-test, eż. għandhom jiġu evitati l-istress ożmotiku u dak tal-pH. Skond il-kimika tat-test, jista' jkun mehtieg li jitqiesu karatteristiċi oħrajn fiżiċi-kimiċi bħala fatturi li jillimitaw l-oghla konċentrazzjoni tat-test. Għal sustanzi relattivament insolubbli li mhumix tossiċi f'konċentrazzjonijiet sal-punt tas-saturazzjoni, l-oghla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb għandha tiġi ttestjata. B'mod ġenerali, il-preċipitazzjoni tal-kimika tat-test fi kwalunkwe mill-konċentrazzjonijiet tat-test għandha tiġi evitata. Il-konċentrazzjoni massima ta' sustanza tat-test m'għandhiex teċċedi 1 000 µg/mL; l-ożmolarità m'għandhiex teċċedi 10 mmolar. Għandu jintuża serje ta' tahlit ġeometriku ta' 8 konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test b'fattur kostanti tat-tahlit (ara t-taqsim 2.1, tieni paragrafu).

Jekk hemm informazzjoni (minn esperiment għas-sejba tal-firxiet) li l-kimika tat-test mhijiex ċitotossika sal-konċentrazzjoni tal-limitu fl-esperiment fid-dlam (-Irr), iżda hija ċitotossika hafna meta tiġi irradjata (+Irr), il-firxiet tal-konċentrazzjoni li għandhom jingħazlu għall-esperiment jistgħu jkunu differenti minn dawk magħżula għall-esperiment (-Irr) biex jintlaħaq ir-rekwizit tal-kwalità xierqa tad-data.

1.4.2.2 *Il-Kontrolli*1.4.2.2.1 *Is-sensittività għar-radjazzjoni taċ-ċelloli, l-istabbiliment tad-data storika:*

Iċ-ċelloli għandhom jiġu ċċekkjati regolarment (madwar kull hames passagġ) għal sensittività għall-ghajn tad-dawl billi tiġi smtata l-vijabbiltà tagħhom wara espożizzjoni għal dożi akbar ta' l-irradjazzjoni. Bosta dożi ta' irradjazzjoni, inkluzi livelli sostanzjalment oghla minn dawk użati għat-test tal-Fototossicità 3T3 NRU għandhom jintużaw f'din l-istima. Dawn id-dożi huma kkwantitati bil-mod l-aktar faċli bil-kejl tal-partijiet UV ta' l-ghajn tad-dawl. Iċ-ċelloli jiġu miżrugħa bid-densità użata fit-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU u irradjati l-ghada. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli mbagħad tiġi ddeterminata jum wara permezz ta' l-użu ta' l-Ahmar Newtrali. Għandu jintwera li l-oghla doża riżultanti li mhijiex ċitotossika (eż. fl-istudju tal-validazzjoni: 5 J/cm² [UVA]) kienet biżżejjed biex il-materjali ta' riferenza (Tabella 1) jiġu kklassifikati tajjeb.

▼B

1.4.2.2.2 Is-sensittività għar-radazzjoni, l-iċċekkjar tat-test kurrenti:

It-test jilhaq il-kriterji ta' kwalità jekk il-kontrolli irradjati negattiv/solventi juru vijabbiltà ta' aktar minn 80 % meta mqabbel ma negattiv/solventi mhux irradjati.

1.4.2.2.3 Il-vijabbiltà tal-kontrolli solventi

Id-densità ottika assoluta ($OD_{540 \text{ NRU}}$) ta' l-Aħmar Newtrali estratt mill-kontrolli tas-solventi jindika jekk il- 1×10^4 ċelloli mizrugħa f'kull well kibrux b'ħin ta' l-irduppar normali matul il-jumejn ta' l-analiżi. Test jilhaq il-kriterji ta' l-aċċettazzjoni jekk l- $OD_{540 \text{ NRU}}$ medju tal-kontrolli mhux ittrattati huwa $\geq 0,4$ (jiġifieri madwar għoxrin darba daqs l-assorbenza tas-solvent fl-isfond).

1.4.2.2.4 Il-kontrolli pożittivi:

Kimika fototossika magħrufa għandha tiġi ttestjata fl-istess ħin ma' kull test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU. Huwa rakkomandat il-chlorpromazine (CPZ). Għal CPZ ittestjat bil-protokoll standard fit-test tal-fototossicità *in vitro* 3T3 NRU, ġew definiti dawn il-kriterji li ġejjin ta' l-aċċettazzjoni tat-test: CPZ irradjat (+Irr): $IC_{50} = 0,1$ sa $2,0 \mu\text{g/ml}$, CPZ mhux irradjat (-Irr): $IC_{50} = 7,0$ sa $90,0 \mu\text{g/mL}$. l-Fattur tal-Foto Irritazzjoni (PIF), għandu jkun > 6 . Il-ħidma storika tal-kontrolli pożittivi għandha tiġi mmonitorjata.

Kimiċi oħrajn fototossiċi, xierqa għall-klassi tal-kimika jew il-karatteristiċi tas-solubbiltà tal-kimika li qed tiġi evalwata, jistgħu jintużaw bħala l-kontrolli pożittivi konkurrenti minflok chlorpromazine.

1.4.3 Il-proċedura tat-test (6)(7)(8)(16)(17):

1.4.3.1 L-1 jum:

Ferra' $100 \mu\text{L}$ materjal tal-kultura fil-kontenituri periferali fi plattina tal-mikrotitru tal-kultura tat-tessut b'96-well (= vojta). F'dawj li jifdal, ferra' $100 \mu\text{L}$ sospensjoni ta' ċelloli ta' 1×10^5 ċelloli/mL fil-mezz tal-kultura (= 1×10^4 ċelloli/well). Għandhom jiġu ppreparati żewġ plattini għal kull serje ta' konċentrazzjonijiet individwali tas-sustanza tat-test, u għall-kontrolli tas-solventi u daww pożittivi.

Inkuba ċ-ċelloli għal 24 siegħa (ara t-taqsim 1.4.1.2) sakemm jiffurmaw nofs monosaff konfluwenti. Dan il-perjodu ta' inkubazzjoni jippermetti l-irkupru taċ-ċelloli, l-aderenza u t-tkabbir esponenzjali.

1.4.3.2 It-2 jum:

Wara l-inkubazzjoni, ferra' l-mezz tal-kultura miċ-ċelloli u aħsel bl-attenzjoni b' $150 \mu\text{L}$ tat-tahlita *buffered* użata għall-inkubazzjoni. Żid $100 \mu\text{L}$ tal-*buffer* li jkun fih il-konċentrazzjoni xierqa tal-kimika jew tas-solvent tat-test (kontroll tas-solvent). Applika 8 konċentrazzjonijiet differenti tal-kimika tat-test. Inkuba ċ-ċelloli bis-sustanza tat-test fid-dlam għal 60 minuta (ara t-taqsim 1.4.1.2 u 1.4.1.4 tieni paragrafu).

Miż-żewġ plattini ppreparati għal kull serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u l-kontrolli, tingħażel waħda, ġeneralment bl-addoċċ, għad-determinazzjoni taċ-ċitotossicità (-Irr) (jiġifieri l-plattina tal-kontroll), u waħda (il-plattina tat-trattament) għad-determinazzjoni tal-fototossicità (+Irr).

▼B

Biex issir l-espożizzjoni +Irr, irraddja ċ-ċelloli f'temperatura ambjentali għal 50 minuta mill-ghatu tal-plattina 96-well bl-oghla doża ta' radjazzjoni li mhijiex ċitotossika (ara wkoll l-Anness 2). Żomm il-plattini mhux irraddjati (-Irr) f'temperatura tal-kamra f'kaxxa mudlama 50 min (= hin ta' l-espożizzjoni għad-dawl).

Ferra' t-tahlita tat-test u aħsel bir-reqqa bl-attenzjoni b'150 µL tat-tahlita *buffered* użata għall-inkubazzjoni, izda li ma fihix il-materjal tat-test. Issostitwixxi l-*buffer* bil-mezz tal-kultura u inkuba (ara t-taqsima 1.4.1.2.) għal lejl shih (18-22 h).

1.4.3.3 *It-3 jum:*

1.4.3.3.1 L-evalwazzjoni mikroskopika

Iċ-ċelloli għandhom jiġu eżaminati għat-tkabbir, għall-morfoloġija, u għall-integrità tal-monosaff bl-użu ta' mikroskopu b'fazi tal-kuntrast. It-tidil fil-morfoloġija taċ-ċelloli u l-effetti fuq it-tkabbir taċ-ċelloli għandu jiġi rrekordjat.

1.4.3.3.2 It-test ta' l-użu ta' l-Aħmar Newtrali

Aħsel iċ-ċelloli b'150 µL *buffer* imsahhan minn qabel. Nehhi t-tahlita tal-ħasil billi ttekket bil-mod. Żid 100 µL ta' 50 µg/mL Aħmar Newtrali (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, numru EINECS 209-035-8; numru CAS 553-24-2; C.I. 50040) f'mezz mingħajr serum (16) u inkuba kif deskritt fil-paragrafu 1.4.1.2., għal 3 h.

Wara l-inkubazzjoni nehhi l-mezz ta' NR, u aħsel iċ-ċelloli b'150 µL mill-*buffer*. Ferra' u nehhi l-żejjed bl-ixxugar jew biċ-ċentrifugazzjoni.

Żid preċiżament 150 µL tahlita NR desorb (ippreparata friska 49 partijiet ilma + 50 partijiet etanol + 1 parti aċidu aċetiku).

Hawwad il-plattina tal-mikrotitru bil-mnod fuq oġġett li jhawwad il-plattina tal-mikrotitru għal 10 minuti sakemm l-NR ikun ġie estratt miċ-ċelloli u jkun iffurma tahlita omoġena. Kejjel id-densità ottika ta' l-estratt ta' l-NR f'540 nm fi spettrofotometru, bl-użu tal-vojt bħala referenza. Issejvja d-data f'format xieraq ta' fajl elettroniku għall-analiżi wara.

2.

ID-DATA

IL-KWALITÀ U L-KWANTITÀ TAD-DATA

Id-data tat-test tippermetti analiżi sinjifikanti tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni, u jekk possibbli l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test li biha l-vijabilità hija mnaqqa għal 50 % (IC₅₀). Jekk tinsab iċ-ċitotossicità, kemm il-firxa tal-konċentrazzjoni kif ukoll l-interċett tal-konċentrazzjonijiet individwali għandhom jiġu stabbiliti b'tali mod li tkun possibbli li toqgħod kurva għad-data sperimentali.

Għar-rizultati kemm ċarament pożittivi kif ukoll dawk ċarament negattivi (ara t-taqsima 2.3, l-ewwel paragrafu), l-esperiment primarju, sostnut minn esperiment(i) wieħed jew aktar preliminary tas-sejba tad-dożi, jista' jkun biżżejjed.

▼B

Ir-rizultati ekwivoċi, li huma fil-limitu, jew mhux ċari għandhom jiġu ċċarati bl-użu ta' aktar ittestjar (ara wkoll it-taqsima 2.4, tieni paragrafu). F'dawn il-kazijiet, il-modifika tal-kundizzjonijiet esperimentali għandha tiġi kkunsidrata. Il-kundizzjonijiet esperimentali li jistgħu jiġu mmodifikati jinkludu l-firxa jew l-isparzar tal-konċentrazzjoni, il-hin ta' qabel l-inkubazzjoni, u l-hin ta' l-espożizzjoni għall-irradjazzjoni. Hin iqsar ta' espożizzjoni jista' jkun xieraq għall-kimiċi li mhumiex stabbli fl-ilma.

L-EVALWAZZJONI TAR-RIZULTATI

Biex tkun possibbli l-evalwazzjoni tad-data, jista' jiġi kkalkolat Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF) jew Foto Effett Medju (MPE – *mean photo effect*).

Għall-kalkolu tal-miżuri tal-fotoċitossicità (ara taht), is-sett ta' valuri diskreti tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni għandu jiġi approssimat b'kurva xierqa kontinwa tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni (mudell). It-tqegħid tal-kurva għad-data spiss isir b'metodu ta' regressjoni mhux lineari (18). Biex tiġi stmata l-influwenza tal-varjabbiltà tad-data fuq il-kurva mqieghda hija rrakkomandata proċedura *bootstrap*.

Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF) jiġi kkalkolat bl-użu ta' din il-formula:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

Jekk ma jistax jiġi kkalkolat l- IC_{50} fil-preżenza jew fin-nuqqas tad-dawl, PIF ma jistax jiġi ddeterminat għall-materjal tat-test. Il-foto-effett medju (MPE) huwa bbażat fuq it-tqabbil tal-kurvi shah tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni (19). Huwa ddefinit bhala l-medju bil-piż tul sett rappreżentattiv ta' valuri tal-foto-effett

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Il-foto-effett PE_i fi kwalunkwe konċentrazzjoni C huwa definit bhala l-prodott ta' l-effett tar-reazzjoni RE_C u l-effett tad-doża DE_C i.e. $\text{PE}_C = \text{RE}_C \times \text{DE}_C$. L-effett tar-reazzjoni RE_C huwa d-differenza bejn ir-reazzjonijiet osservati fin-nuqqas u fil-preżenza tad-dawl, jiġifieri. $\text{RE}_C = R_C(-\text{Irr}) - R_C(+\text{Irr})$. L-effett tad-doża jingħata b':

$$\text{DE}_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

fejn C^* tirrappreżenta l-konċentrazzjoni ta' l-ekwivalenza, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha r-reazzjoni ta' +Irr hija daqs ir-reazzjoni ta' -Irr fil-konċentrazzjoni C . Jekk C^* ma tista'x tiġi determinata minhabba li l-valuri tar-reazzjoni tal-kurva +Irr huma sistematikament oghla jew aktar baxxi minn $R_C(-\text{Irr})$ l-effett tad-doża huwa stabbilit bhala 1. Il-fatturi tal-piżijiet w_i jingħataw bl-ogħla valur ta' reazzjoni, jiġifieri $w_i = \text{MAX} \{R_i(+\text{Irr}), R_i(-\text{Irr})\}$. Ix-xibka tal-kaxxi tal-konċentrazzjoni C_i tingħażel b'tali mod li l-istess għadd ta' punti jaqa' taht kull wiehed mill-intervalli tal-konċentrazzjoni definiti mill-valuri tal-konċentrazzjoni użati fl-esperiment. Il-kalkolu ta' l-MPE huwa ristrett għall-valur massimu ta' konċentrazzjoni li fiha għall-inqas wahda miż-żewġ kurvi għadha turi valur ta' reazzjoni ta' mhux inqas minn 10 %. Jekk din il-konċentrazzjoni massima hija oghla mill-ogħla konċentrazzjoni użata fl-esperiment +Irr il-parti residwali tal-kurva +Irr hija stabbilita bhala l-valur ta' reazzjoni "0". Skond jekk il-valur ta' l-MPE huwiex akbar minn valur ta' limitu magħżul tajjeb ($\text{MPE}_C = 0,15$), il-kimika hija kklassifikata bhala fototossika.

▼B

Pakkett ta' softwer għall-kalkolu tal-PIF u tal-MPE huwa disponibbli minn (20).

L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Fuq bażi ta' l-istudju tal-validazzjoni (8), sustanza tat-test b'PIF < 2 jew MPE < 0,1 tbassar: "ebda fototossicità". PIF > 2 u < 5 jew MPE > 0,1 u < 0,15 tbassar: "fototossicità probabbli"; u PIF > 5 jew MPE > 0,15 tbassar: "fototossicità".

Għal kwalunkwe laboratorju li jista' bbilixxi din l-analizi għall-ewwel darba, il-materjali ta' riferenza elenkati fit-Tabella 1 għandhom jiġu ttestjati qabel ma jiġu ttestjati s-sustanzi tat-test għall-istima fototossika. Il-valuri tal-PIF jew ta' l-MPE għandhom ikunu qrib il-valuri msemija fit-Tabella 1.

Tabella 1

Isem il-kimika	Nru EINECS	Nru CAS	PIF	MPE	L-oghla punt ta' l-assorbiment	Solvent ⁽¹⁾
Amiodarone HCL	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (fl-ispalla)	ehanol
Choloropromazine HCL	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitrile
Anthracene	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-Histidine		[7006-35-1]	no PIF	0,05-0,10	211 nm	Ilma
Hexachloroprophe ne	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (fl-ispalla)	etanol
Sodium lauryl sulphate	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	l-ebda assorbiment	Ilma

⁽¹⁾ Solvent użat biex jitkejjel l-assorbiment.

L-INTERPRETAZZJONI TAD-DATA

Jekk l-effetti fototossiċi huma osservati biss fl-oghla test tal-koncentrazzjoni (speċjalment għall-kimiċi tat-test li jinhallu fl-ilma) jistgħu jkunu mehtieġa kunsiderazzjonijiet addizzjonali għall-istima ta' l-azzard. Dawn jistgħu jinkludu d-data dwar l-assorbiment mill-ġilda, u l-akkumulazzjoni tal-kimika fil-ġilda u/jew data minn testijiet oħrajn, eż. l-ittestjar tal-kimika fil-ġilda ta' l-annimali jew umana *in vitro*, jew mudelli tal-ġilda.

▼B

Jekk ma tintwera ebda tossiċità (+Irr u -Irr), u jekk is-solubilità llimitat il-konċentrazzjonijiet li setghu jiġu ttestjati, il-kompatibilità tas-sustanza tat-test ma' l-analiżi tista' tiġi fid-dubju u t-testjar konfermatorju għandu jiġi kkonsidrat bl-użu, eż. ta' mudell ieħor.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. **IR-RAPPORT TAT-TEST**

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

Is-Sustanza tat-Test:

- id-data ta' l-identifikazzjoni, ismijiet ġeneriċi komuni u n-numri IUPAC u CAS, jekk magħrufin;
- in-natura fizika u safa;
- il-karatteristiċi fiżikokimiċi jekk inhuma rilevanti għat-twettiq ta' l-istudju;
- l-ispettru ta' l-assorbiment UV/vis;
- l-istabilità, u l-fotostabilità jekk magħrufin.

Solvent:

- ġustifikazzjoni għall-ghażla tas-solvent;
- solubilità tal-kimika tat-test fis-solvent;
- persentaġġ tas-solvent preżenti fil-mezz tat-trattament.

Iċ-ċelloli

- tip u għajn taċ-ċelloli;
- nuqqas ta' mycoplasma;
- l-għadd tal-moġħdija taċ-ċelloli, jekk magħruf;
- Is-sensittività taċ-ċelloli għar-radjażzjoni, ddeterminata bit-tagħmir ta' l-irradjażzjoni użat fit-test tal-fototossiċità *in vitro* 3T3 NRU;

Il-kundizzjonijiet tat-test (1); *inkubazzjoni qabel u wara t-trattament*:

- tip u kompożizzjoni tal-mezz tal-kultura;
- kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni (konċentrazzjoni ta' CO₂; temperatura; umdità);
- kemm iddum l-inkubazzjoni (qabel it-trattament; wara t-trattament).

Il-kundizzjonijiet tat-test (2); *trattament bil-kimika*:

- ir-raġuni għall-ghażla tal-konċentrazzjonijiet tal-kimika tat-test użati fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjażzjoni;
- fil-każ ta' solubilità limitata tal-kimika tat-test u ta' nuqqas ta' ċitotossiċità: ir-raġuni għall-oghla konċentrazzjoni ttestjata;
- tip u kompożizzjoni tal-mezz tat-trattament (tahlita ta' melh buffered);
- kemm idum it-trattament kimiku.

Il-kundizzjonijiet tat-test (3); *l-irradjażzjoni*:

- ir-raġuni għall-ghażla ta' l-għajn tad-dawl użat;

▼B

- manifattur u tip ta' għajn tad-dawl u radjometru;
- karatteristiċi ta' l-irradjanza spettrali ta' l-għajn tad-dawl;
- karatteristiċi ta' trażmissjoni u assorbiment tal-filtru/i użat(i);
- karatteristiċi tar-radjometru u d-dettalji dwar il-kalibrazzjoni tiegħu;
- distanza ta' l-għajn tad-dawl mis-sistema tat-test;
- l-irradjanza tal-UVA f'din id-distanza, espresso f' mW/cm^2 ;
- kemm iddum l-espożizzjoni tad-dawl UV/vis;
- doża ta' l-UVA (irradjanza x ħin), espressa f' J/cm^2 ;
- temperatura tal-kulturi taċ-ċelloli matul l-irradjazzjoni u l-kulturi taċ-ċelloli li jinżammu fid-dlam konkurrentement.

Il-kundizzjonijiet tat-test (4); *test tal-vijabilità ta' l-Aħmar Newtrali*:

- kompożizzjoni tal-mezz tat-trattament ta' l-Aħmar Newtrali;
- kemm iddum l-inkubazzjoni ta' l-Aħmar Newtrali;
- kundizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni (konċentrazzjoni ta' CO_2 ; temperatura; umdità);
- kundizzjonijiet ta' l-estrazzjoni ta' l-Aħmar Newtrali (estrattant; kemm idum);
- *wavelength* użata għall-qari spettrofotometriku tad-densità ottika ta' l-Aħmar Newtrali;
- tieni *wavelength* (referenza), jekk tintuża;
- kontenut ta' vojt ta' l-ispettrophotometru, jekk użat.

Riżultati:

- il-vijabilità taċ-ċelloli miksuba f'kull konċentrazzjoni tal-kimika tat-test, espressa f'persentaġġ ta' vijabilità ta' kontrolli solventi medji u konkurrenti;
- kurvi tar-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni (konċentrazzjoni tal-kimika tat-test vs. vijabilità relattiva taċ-ċelloli) miksuba f'esperimenti konkurrenti +Irr u -Irr;
- analiżi tal-kurvi tar-reazzjoni tal-konċentrazzjoni: jekk possibbli, il-komputazzjoni/kalkolu ta' IC_{50} (+Irr) u IC_{50} (-Irr);
- tqabbil ta' żewġ kurvi tar-reazzjonijiet tal-konċentrazzjoni miksuba fil-preżenza u fin-nuqqas ta' l-irradjazzjoni, bil-kalkolu tal-Fattur tal-Foto-Irritazzjoni (PIF), jew bil-kalkolu tal-Foto Effett Medju (MPE);
- il-kriterji ta' l-aċċettazzjoni tat-test; il-kontroll konkurrenti tas-solvent;
- il-vijabilità assoluta (densità ottika ta' l-estratt ta' l-Aħmar Newtrali) ta' ċelloli irradjati u mhux irradjati;
- id-data storika tal-kontrolli negattivi u dawk solventi; devjazzjonijiet medji u dawk standard;
- kriterji ta' l-aċċettazzjoni tat-test; kontroll pozittiv konkurrenti;

▼B

— IC₅₀(+Irr) u IC₅₀(-Irr) u PIF/MPE tal-kimika tal-kontroll pożittiv;

— id-data storika tal-kontrolli pożittivi kimiċi: IC₅₀(+Irr) u IC₅₀(-Irr) u PIF/MPE; devjazzjonijiet medji u dawk standard.

Diskussjoni tar-riżultati.

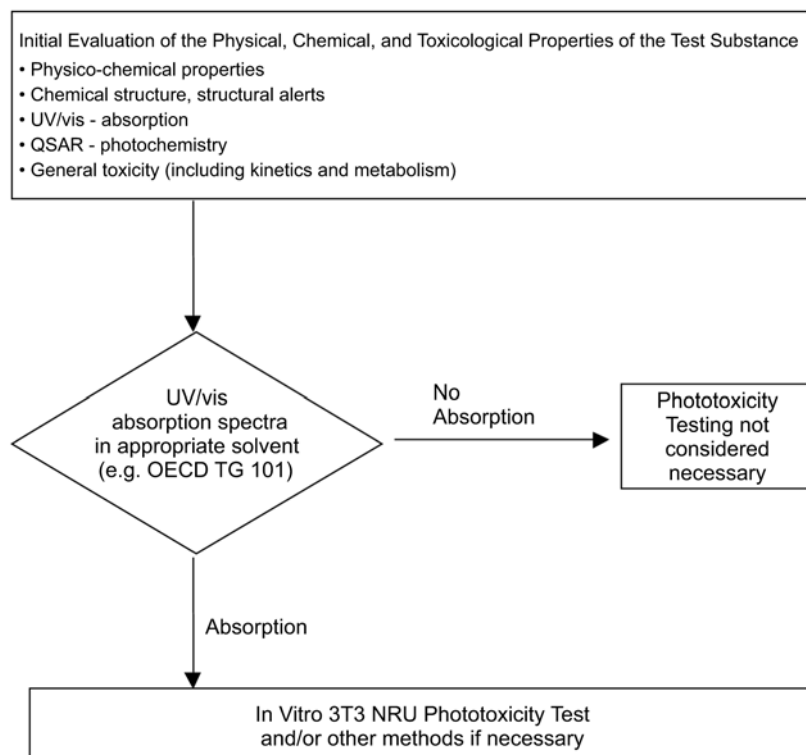
Kunklużjonijiet.

4.**REFERENZI**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. *In vitro* 7: 95-102.
2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-V.
3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.
4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. Tieni edizzjoni, p 79-110.
5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Parigi.
6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. *In vitro* 8, 793-796.
7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 ta' Novembru 1997, ATLA, 26, 7-8.
8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. *In vitro* 12, 305-327.
9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15 ta' Marzu 2002, OECD ENV/EHS, disponibbli fuq talba mis-Segretarjat.
10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.
11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

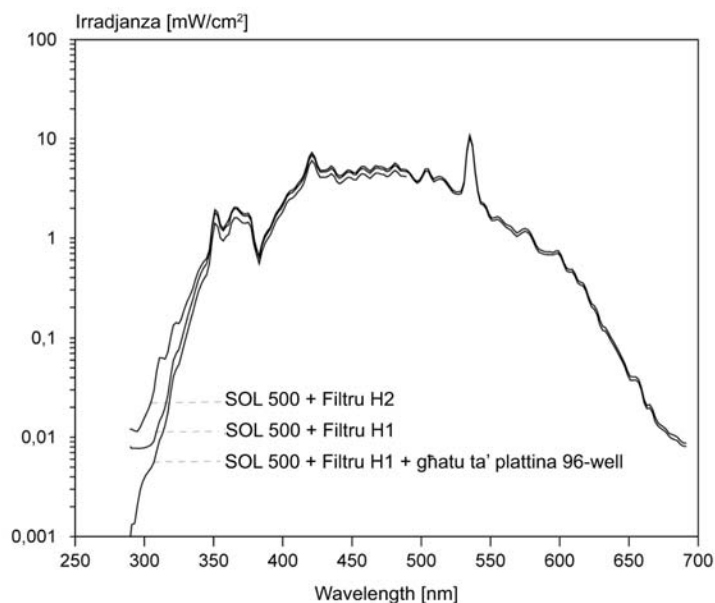
12. Lambert L.A., Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. Hames edizzjoni, p 515-530.
13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
14. ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.
15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
16. ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 ta' Settembru, 1998. 18 paġni.
17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679-708.
18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445-462.
20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼ B*L-ANNEX I***Ir-rwol tat-3T3 NRU PT fi strateġija sekwenzjali għall-ittestjar tal-fototossicità tal-kimiċi**

▼ B

L-ANNESS 2

Figura 1

Distribuzzjoni ta' poter spettrali tas-simulatur tax-xemx iffiltrat

(ara t-taqsima 1.4.1.5, tieni paragrafu)

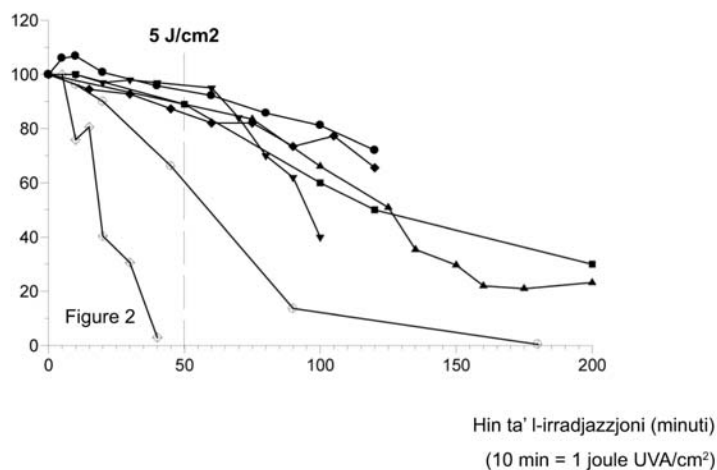
Il-Figura 1 tagħti eżempju ta' distribuzzjoni ta' irradianza spettrali aċċettabbli ta' simulatur tax-xemx iffiltrat. Huwa mill-ghajn ta' alid tal-metall *doped* fil-prova tal-validazzjoni tat-3T3 NRU PT (6)(8)(17). L-effett ta' żewġ filtri differenti użati u l-effett addizzjoni ta' filtri ta' l-għatu ta' plattina 96-well tal-kultura huma murija. Il-filtru H2 intuża biss ma' sistemi tat-test li jistgħu jittolleraw ammont oġġla ta' UVB (test tal-mudell tal-gilda u ttest tal-fotohemolizi taċ-ċelloli homor tad-dem). Fit-3T3 NRU-PT intuża l-filtru H1. Il-figura turi li l-effett addizzjonali ta' filtru ta' l-għatu tal-plattina huwa l-aktar osservat fil-firxa ta' l-UVB, u xorta jhallu biżżejjed UVB fl-ispettru ta' l-irradjazzjoni biex jiġu eċċitati l-kimiċi li tipikament jassorbu l-firxa ta' l-UVB, bħall-Amiodarone (ara t-Tabella 1).

$\nabla \underline{\mathbf{B}}$

Figura 2

Is-sensittività ta' l-irradjazzjoni taċ-ċelloli Balb/c 3T3 (kif imkejla fil-firxa UVA)

Il-vijabilità taċ-ċelloli (% użu ta' l-Aħmar Newtrali tal-kontrolli skuri)



(ara t-taqsimiet 1.4.1.5.2 tieni paragrafu; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Is-sensittività taċ-ċelloli Balb/c 3T3 għall-irradjazzjoni mas-simulatur tax-xemx użat fil-prova tal-validazzjoni tat-Test tal-Fototossicità 3T3NRU, kif imkejla fil-firxa ta' l-UVA. Il-figura turi r-riżultati miksuba f'7 laboratorji differenti fl-istudju tal-pre-validazzjoni (1). Filwaqt li ż-żewġ kurvi b'simboli miftuħa nkisbu b'ċelloli li saru anzjanji (numru għoli ta' passaġġi), li kellhom jiġu sostitwiti b'ħażniet ta' ċelloli godda il-kurvi bis-simboli li jispikkaw juru ċ-ċelloli b'tolleranza ta' irradjazzjoni aċċettabbli.

Minn din id-data giet derivata l-ogħla irradjazzjoni mhux ċitotossika ta' 5 J/cm^2 (linja ttikkjata vertikali). Il-linja ttikkjata orizzontali turi barra minn dan l-effett massimu aċċettabli ta' l-irradjazzjoni mogħti fil-paragrafu 1.4.2.2.

▼ M3

B.42. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULA TAL-LIMFA LOKALI**INTRODUZZJONI**

1. Il-Linja gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Testjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, htigijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. Il-Metodu ta' Testjar oriġinali (TM) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali (LLNA; Linja Gwida ta' Testjar 429 tal-OECD; il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness) ġie adottat qabel (1) Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). L-LLNA aġġornata hija bbażata fuq l-evalwazzjoni tal-esperjenza u tad-dejta xjentifika (12). Dan huwa t-tieni TM imfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u tahlitiet) fl-annimali. It-TM l-iehor (jiġifieri l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar; il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness) juża testijiet fuq il-fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA tipprovdni vantaġġi fuq il-B.6 u fuq il-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) fir-rigward tal-benessri tal-annimali. Dan it-TM aġġornat tal-LLNA jinkludi sett ta' Standards ta' Prestazzjoni (PS) (Appendiċi 1) li jistgħu jintużaw fl-evalwazzjoni tal-istatus ta' validazzjoni ta' metodi ġodda u/jew mibdula ta' testjar li huma mekkanikament u funzjonalment simili għall-LLNA, f'konformità mal-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida Nru 34 tal-OECD (14).
2. L-LLNA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovdni dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Għandu jiġi nnotat li s-sensitizzaturi hfief/moderati li huma rrakkomandati bħala sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv adattati (PC) għall-metodi ta' testjar fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B. 6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) huma adattati wkoll għall-użu mal-LLNA (6) (8) (15). L-approċċ ta' LLNA mnaqqsa (rLLNA), li tista' tuża sa 40 % inqas annimali huwa deskritt ukoll bħala għażla f'dan it-TM (16) (17) (18). L-rLLNA tista' tintuża meta jkun hemm htieġa regolatorja li tiġi kkonfermata previżjoni negattiva tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha ta' protokoll tal-LLNA, kif deskritt f'dan it-TM. Il-previżjoni ta' eżitu negattiv għandha ssir fuq il-bażi tal-informazzjoni kollha disponibbli kif deskritt fil-paragrafu 4. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u logika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk, kontra dak mistenni, jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku fl-rLLNA, jista' jkun mehtieġ aktar ittestjar sabiex tiġi interpretata jew iċċarata s-sejba. L-rLLNA ma għandhiex tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi ta' testijiet li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda meta tkun mehtieġa informazzjoni dwar ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni bħas-subkategorizzazzjoni għar-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-tahlitiet u s-Sistema Globalment Armonizzata tan-NU tal-Klassifikazzjoni u t-Tikkettar tas-Sustanzi Kimiċi.

DEFINIZZJONIJIET

3. Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA tipprovdni metodu alternattiv għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jistgħu jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda. Dan mhux neċessarjament jimplika li l-LLNA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi fil-kazijiet kollha (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jehtieġu aktar konferma. Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq

▼ M3

l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fizikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wiehed jiddetermina jekk l-LLNA hijiex adattata għas-sustanza (minhabba n-nuqqas ta' kompatibilità ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA-ara l-paragrafu 5) u sabiex tghin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allergiku. Għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-ghan. Barra minn hekk, l-LLNA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġiġh u tbatija) fil-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar tas-sensitizzazzjoni ta' kuntatt allergiku. L-LLNA hija bbażata fuq il-konsiderazzjoni ta' avvenimenti immunoloġiċi stimolati b'sustanzi kimiċi matul il-fażi induttiva tas-sensitizzazzjoni. Għall-kuntrarju tat-testijiet fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13) l-LLNA ma teħtieġx li r-reazzjonijiet tal-ipersensittività tal-gilda indotti bi sfida jkunu eluċidati. Barra minn hekk, l-LLNA ma teħtieġx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni fuq il-fenek tal-Indi (13). Għalhekk, l-LLNA tnaqqas l-uġiġh u t-tbatija tal-annimali. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar, għandu jkun rikonoxxut li hemm ċerti limitazzjonijiet li jistgħu jkunu jeħtieġu l-użu ta' B.6 jew tal-Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar (13) (eż. sejbiet negattivi foloz fl-LLNA b'ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-gilda [bħal ċerti sustanzi kimiċi tat-tip tensjoattivi] (19) (20), jew solubbiltà tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (21) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tal-OECD għall-Ittestjar) (13). Barra minn hekk, skont il-bażi tad-dejta ta' validazzjoni limitata, li kienet tikkonsisti prinċipalment minn formulazzjonijiet ta' pesticidi, l-LLNA aktarx li tagħti aktar riżultat pożittiv mit-test fuq il-fniek tal-Indi għal dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test (22). Madankollu, meta wiehed jeżamina l-formulazzjonijiet, jista' jikkunsidra li jinkludi sustanzi simili b'riżultati magħrufa bħala sustanzi ta' referenza sabiex juri li l-LLNA qiegħda taħdem kif suppost (ara l-paragrafu 16). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA għandha tkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfociti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allergen applikat u tipprovdi mezz sempliċi ta' kif wiehed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wiehed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (vehicle treated control, VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjah l-Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI), jiġi stabilizzat, u għandu jkun ≥ 3 qabel ma tkun meħtieġa l-klassifikazzjoni tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-gilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu ta' tikkettar radjoattiv *in vivo* għall-kejl ta' zieda fl-għadd ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. Madankollu, jistgħu jintużaw għanijiet finali oħrajn għall-valutazzjoni tal-għadd ta' ċelloli proliferanti sakemm ir-rekwiżiti tal-PS ikunu għalkollox issodisfati (Appendiċi 1).

▼ M3

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

L-ghażla tal-ispeċijiet tal-annimali

7. Il-gurdien huwa l-ispeċi magħżula għal dan it-test. Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħażaġh tar-razza CBA/Ca jew CBA/J, li jkunu għadhom mhux mġhamra u mhux tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 u 12-il ġimġha, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistghu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA.

Il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ u l-ghalf

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (23), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqegħid tal-ġrieden f'gaġeġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umdità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 % hlief waqt it-tindif tal-kamra, l-ghan għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, u 12-il siegħa dlam. Għall-ghalf, jistghu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-thejjija tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħazlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistghu jiġu identifikati individwalment (izda mingħajr l-ebda forma ta' mmarkar fil-widnejn), u mizmuma fil-gaġeġ tagħhom għal mill-inqas hamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistghu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel ma jibda t-trattament, l-annimali kollha għandhom jiġu eżaminati sabiex jiġi żgurat li ma jkollhom l-ebda ferita osservabbli fuq il-ġilda.

It-thejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinhallu jew jiġu sospizi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistghu jiġu applikati wahedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinhallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżagerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistghu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jithejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistghu jinhaznu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Is-sustanzi kimiċi ta' kontrolli pozittivi (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreagixxu b'sensittività adegwata u riproduttibbli bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inkluzjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju li jwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Huwa mehtieg ukoll PC għal kull studju wkoll minn ċerti awtoritajiet regolatorji u għaldaqstant l-utenti huma mhegga sabiex jikkonsultaw lill-awtoritajiet rilevanti qabel ma jwettqu l-LLNA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-htieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlaħqu r-rekwiziti li jistghu jinholqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi reazzjoni tal-LLNA pożittiva flivell ta' esponiment li mistenni

▼ M3

jaghti zieda $fl-SI > 3$ fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni tkun riproducibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri $SI > 20$ ikun eċċessiv). Il-PC preferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Chemical Abstracts Service [CAS] Nru tal-CAS 101-86-0) fl-aċetun: żejt taż-żebuga (4:1, v/v) u 5 % merkaptobenżotijazol (Nru tal-CAS 149-30-4) f'*N,N*-dimetilformammid (ara l-Appendiċi 1, it-Tabella 1). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minhabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Ghalkemm l-inkluzjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perijodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storiku stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproducibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' zmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena).
13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluz meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA (eż. bidla fil-persunal imharreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reagenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom ikunu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-htieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.
14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perijodika minflok fl-istess hin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattiv ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perijodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perijodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perijodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perijodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjużi. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jiġi deċiż jekk għandhomx ikunu inkluzi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perijodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (12).
15. Ghalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebuga; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti klinikament/kimikament) ikun mehtieġ ukoll (24). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluz VC separat għall-PC simultanju.
16. F'każijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jahdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:
 - xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,
 - karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,
 - dejta ta' appoġġ mil-LLNA,
 - dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

▼ M3

IL-PROCEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli ta' doża

17. Minimu ta' erba' annimali għandhom jintużaw għal kull grupp ta' doża, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrar tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dozi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wiehed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Hlief għan-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom ikunu mmanigġjati u ttrattati bl-istess mod bħall-annimali fil-gruppi tat-trattament.

18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (3) u (5). Dozi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkun disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-oġġa konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (3) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun mehtieg test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).

19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-risultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-oġġa konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebuga (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (19) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet jista' jkun mehtieg li jintuża solvent klinikament rilevanti jew il-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test tkun ikkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi tat-test idrofiliċi jkun inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jhollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezzi għalkollox likwidi għandhom jiġu evitati.

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara l-paragrafu 35). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-għadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tingabar dejta dwar annimali individwali (12). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-gbir ta' dejta dwar annimali individwali. Madankollu, id-dejta dwar gruppi ta' annimali tista' titqies aċċettabbli minn ċerti awtoritajiet regolatorji u f'dawn is-sitwazzjonijiet, l-utenti jista' jkollhom l-għażla li jiġbru kemm dejta dwar annimali individwali kif ukoll dejta dwar gruppi ta' annimali.

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun iddeterminata l-oġġa doża li għandha tiġi ttestjata (ara l-paragrafu (18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi ddefinit il-livell ta' doża xierqa li għandha tkun ittestjata fl-LLNA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-għażla tal-livell massimu ta' doża li għandu jintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara l-paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara l-paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.

▼ M3

22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir skont l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA, hlief għall-fatt li ma jkunx hemm valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wiehed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Il-widnejn ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema (hmura) u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittiehed il-kejl tal-hxuna tal-widna permezz ta' gejjg ta' hxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejjg tal-hxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u f'Jum 6. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-hxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immakar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥ 3 u/jew zieda fil-hxuna tal-widna ta' $\geq 25\%$ fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-oghla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensiela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (hmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut ohxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra zieda ta' 25 % fil-hxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll zieda statistikament sinifikanti fil-hxuna tal-widna fil-ġrieden ittrattati meta mqabbla mal-ġrieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jsehħu židiet statistikament sinifikanti meta l-hxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jindikaw tossiċità sistemika (35) (36) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, roġħda, u konvulzjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispnea, nifs maqtugħ, u hsejjes fil-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku ieħor ta' aktar minn uġiħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' $> 5\%$ fil-piż tal-ġisem mill-ewwel Jum sas-sitt Jum, u l-imwiet għandhom jiġu kkunsidrati fil-valutazzjoni. Annimali li waslu biex imutu jew annimali li jkunu viżibbilment muġugħa jew li juru sinjali ta' tbatija kbira u persistenti għandhom jinqatlu b'mod uman (37).

▼ M3

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda ta' sperimentazzjoni tal-analiżi hija kif ġej:

- *L-ewwel Jum*: Identifika individwalment u hu nota tal-piż ta' kull animal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz wahdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrati tal-paragrafi 11-15), fuq il-wara ta' kull widna.
- *It-tieni u t-tielet Jum*: Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li ghamilt fl-ewwel Jum.
- *Ir-raba' u l-ħames Jum*: L-ebda trattament.
- *Is-sitt jum*: Hu nota tal-piż ta' kull animal. Injetta 250 µL ta' soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (phosphate-buffered saline, PBS) sterili li fih 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) ta' (^{3} H)-metiltimidin ittritjat fil-grieden kollha tat-test u tal-kontroll permezz tal-vina fid-denb. Inkella, injetta 250 µL PBS sterili li fih 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ta' ^{125} I-jododeossiridin u 10^{-5} M fluworodeossiridin fil-grieden kollha permezz tal-vina fid-denb. Hames (5) sigħat wara, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' n-noduli limfatiċi awrikolari li jnixxu minn kull widna tal-grieden u pproċessa flimkien f'PBS għal kull animal (metodu b'annimali individwali); inkella aqta' u iġbor in-noduli limfatiċi minn kull widna f'PBS għal kull grupp ta' trattament (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura). Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (12). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-ġilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inklużi parametri oħrajn bħall-ġhoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-ħxuna tal-widna (miksba kemm permezz ta' geġ tal-ħxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarkar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

It-tiejja tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Sospensjoni ta' ċellola wahda ta' ċelloli tan-noduli limfatiċi (LNC) maqtugħa minn żewġ naħat permezz tal-metodu b'annimali individwali jew inkella, il-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura tittejjja permezz ta' diżaggregazzjoni mekkanika ħafifa minn ġo garża ta' 200 micron-tal-azzar inossidabbli jew teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta' sospensjoni ta' ċellola wahda. L-LNC jinhaslu darbtejn b'eċċess ta' PBS u d-DNA jiġi sseparat b'5 % aċidu trikloroaċetiku (TCA) f'4 °C għal 18-il siegħa (3). Il-pelits jew jiġu sospizi mill-ġdid f'1mL TCA u trasferiti f'kun-jetti ta' xintillazzjoni li jkun fihom 10mL ta' likwidu ta' xintillazzjoni għall-ghadd ta' ^{3} H, jew trasferiti direttament f'tubi għall-ghadd tal-gamma għall-ghadd ta' ^{125} I.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli (radjuattività inkorporata)

27. L-inkorporazzjoni ta' ^{3} H-metiltimidin titkejjel bl-ghadd ta' xintillazzjoni β bħala diżintegrazzjonijiet kull minuta (DPM). L-inkorporazzjoni ta' ^{125} I-jododeossiridin titkejjel bl-ghadd ta' ^{125} I u hija espressa wkoll bħala DPM. Skont il-metodu użat, l-inkorporazzjoni hija espressa bħala DPM/gurdien (metodu b'annimali individwali) jew DPM/grupp ta' trattament (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura).

LLNA mnaqqas

28. F'ċerti sitwazzjonijiet, meta jkun hemm htieġa regolatorja li tkun ikkonfermata l-previzjoni negattiva tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda, jista' jintuża protokoll fakultattiv ta' rLLNA (16) (17) (18) b'inqas annimali, sakemm ikun hemm konformità mal-ispeċifikazzjonijiet l-oħrajn kollha tal-protokoll tal-LLNA f'dan it-TM. Qabel ma jiġi applikat l-approċċ ta' rLLNA, għandhom jiġu pprovduti ġustifikazzjonijiet ċari u loġika xjentifika għall-użu tiegħu. Jekk jinkiseb riżultat pożittiv jew ekwivoku, jista' jkun meħtieġ aktar ittestjar sabiex is-sejba tiġi interpretata jew iċċarata.

▼ M3

29. It-tnaqqis fl-ghadd ta' gruppi ta' dozi huwa l-unika differenza bejn il-protokoll tal-metodi tat-testijiet LLNA u rLLNA u għal din ir-raġuni l-rLLNA ma tippovdix informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Għalhekk, l-rLLNA ma għandhiex tintuża meta tkun meħtieġa informazzjoni dwar id-doża u r-reazzjoni. Bħal-LLNA b'diversi dozi, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test ivvalutata fl-rLLNA għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma tikkawżax tossiċità sistemika evidenti u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-gilda fil-gurdien (ara l-paragrafu 18).

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

30. Kull gurdien għandu jkun osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull gurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-gilda, jew tmermir tal-gilda għall-ewtanazja (37).

Pizijiet tal-ġisem

31. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-pizijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman li tkun skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

32. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI. Meta jintuża l-metodu b'annimali individwali, l-SI jinstab billi wiehed jiddividi d-DPM/gurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp PC, bid-DPM/gurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wiehed. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, l-SI jinstab billi wiehed jiddividi l-inkorporazzjoni radjuattiva miġbura għal kull grupp ta' trattament bl-inkorporazzjoni tal-grupp VC miġbur; dan jagħti SI medju.
33. Il-proċess ta' deċiżjoni jqis riżultat pożittiv meta $l-SI \geq 3$. Madankollu, il-qawwa tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wiehed jiddetermina jekk riżultat marginali jiġix iddikjarat pożittiv (4)(5)(6).
34. Jekk ikun jeħtieġ li jiġu ċċarati r-riżultati miksuba, għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li jgħolqu sensitizzazzjoni fil-gilda, jekk tikkawżax irritazzjoni lokali eċċessiva fil-gilda tal-gurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (7).
35. Il-ġbir ta' dejta dwar ir-radjuattività fil-livell tal-gurdien individwali jippermetti analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull evalwazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari ma' tqabbil ta' VC simultani). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-evalwazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħzel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jeħtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ ir-riċerkatur jista' jeħtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi bi jew mingħajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejhu "anomaliji" (outliers)).

▼ **M3****DEJTA U RAPPORTAR****Dejta**

36. Id-dejta għandha titqassar f'tabelli. Meta wiehed juża l-metodu b'annimali individwali, għandu juri l-valuri DPM tal-annimal individwali, il-medja DPM/annimal tal-grupp, it-terminu tal-iżball assoċjat tagħha (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mal-grupp VC simultanju. Meta jintuża l-metodu bi gruppi ta' trattament miġbura, wiehed għandu juri l-medja tad-DPM u l-SI medju għal kull grupp ta' doża mqabbel mal-grupp VC simultanju.

Rapport tat-test

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

Sustanzi tat-test u ta' kontroll:

- dejta dwar l-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impurità; magħrufa; in-numru tal-lott),
- in-natura fizika u l-proprietajiet fizikokimiċi (eż. volatilità, stabbiltà, solubbiltà),
- f'każ ta' tahlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti.

Solvent/mezz:

- dejta dwar l-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat),
- raġuni għall-għażla tal-mezz.

Annimali tat-test:

- is-sors tal-ġrieden CBA,
- stat mikrobijologiku tal-annimali, meta jkun magħruf,
- l-għadd u l-età tal-annimali,
- is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.

Kundizzjonijiet tat-test:

- dettalji dwar it-thejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,
- raġuni għall-għażla tad-doża (inkluzi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),
- il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata,
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluz it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),
- dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-tehid ta' kampjuni,
- metodi ta' kejl tat-tossiċità,
- kriterji li ntuzaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pozittivi jew negattivi,
- dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju.

Kontroll tal-affidabbiltà:

- sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluz informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użat,
- dejta dwar PC simultanju u/jew storiku u dwar NC simultanju għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,

▼ **M3**

- jekk ma kienx inkluz PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perijodu reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storiku għall-laboratorju li jiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju.

Riżultati:

- pizijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,
- il-hin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull animal,
- tabella tal-valuri DPM u tal-valuri SI għal kull ġurdien (metodu b'animali individwali) jew medji (metodu bi gruppi ta' trattament miġbura) għal kull grupp ta' trattament,
- il-medja u t-terminu ta' żball assoċjat (eż. SD, SEM) għad-DPM/ġurdien għal kull grupp ta' trattament u r-riżultati tal-analiżi tal-anomaliji għal kull grupp ta' trattament meta jintuża l-metodu b'animali individwali,
- l-SI kkalkulat u kejl xieraq ta' varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-animali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll meta jintuża l-metodu b'animali individwali,
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,
- analizzijiet statistiċi, fejn xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati:

- kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analizzijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konkluzzjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165–169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13–31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999–1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985–997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–33.

▼ M3

- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49–59.
- (9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258–273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274–286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249–257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf]
- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281–284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181–185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/lnarep.pdf]

▼ M3

- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896–1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90–96.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195–206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491–506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60–68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfisteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023–1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

- (37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

*Appendiċi 1***Standards tal-prestazzjoni għall-valutazzjoni ta' metodi ta' ttestjar LLNA (Local Lymph Node Assay) simili jew modifikati għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda****INTRODUZZJONI**

1. L-għan tal-Istandards tal-Prestazzjoni (Performance Standards, PS) huwa li jikkomunikaw il-bażi li fuqha l-metodi ta' ttestjar, kemm ta' speċjalità (jiġifieri bid-dritt tal-awtur, bil-marka kummerċjali, irregistrati) kif ukoll ġeneriċi jistgħu jiġu ddeterminati li għandhom biżżejjed preċiżjoni u affidabbiltà għal raġunijiet speċifiċi ta' ttestjar. Dawn il-PS, ibbażati fuq metodi ta' ttestjar validati u aċċettati, jistgħu jintużaw sabiex jevalwaw l-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodi simili oħra (li fil-lingwaġġ tat-taħdit komuni jissejgħu testijiet "me-too") li huma bbażati fuq prinċipji xjentifiċi simili u sabiex ikejlu jew ibassru l-istess effett bijoloġiku jew tossiku (14).
 2. Qabel l-adozzjoni tal-metodi modifikati (jiġifieri, titjib potenzjali propost għal metodu ta' ttestjar approvat), għandu jkun hemm evalwazzjoni sabiex jiġi ddeterminat l-effett tal-bidliet proposti fuq il-prestazzjoni tat-test u sa fejn dawn il-bidliet jaffettwaw l-informazzjoni disponibbli għall-komponenti l-oħra tal-proċess ta' validazzjoni. Skont l-għadd u t-tip ta' bidliet proposti, id-dejta u d-dokumentazzjoni ta' prova ġġenerati għal dawk il-bidliet, dawn għandhom ikunu jew soġġetti għall-istess proċess ta' validazzjoni kif spjegat għal test ġdid, jew, jekk dan ikun xieraq, għal valutazzjoni limitata ta' affidabbiltà u rilevanza billi jintużaw il-PS stabbiliti (14).
 3. Metodi simili jew modifikati proposti għall-użu f'dan it-TM (Test Method) għandhom jiġu evalwati sabiex jiġu ddeterminati l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tagħhom billi jintużaw sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw il-firxa sħiħa tar-riżultati tal-LLNA. Sabiex jiġi evitat l-użu mhux neċessarju ta' annimali, huwa ferm rakkomandat li l-iżviluppaturi tal-mudell jikkonsultaw lill-awtoritajiet xierqa qabel ma jibdew l-istudji ta' validazzjoni, f'konformità mal-PS u l-gwida pprovduti f'dan it-TM.
 4. Dawn il-PS huma bbażati fuq il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Gappuniż, sabiex jiġu vvalidati verżjonijiet simili jew modifikati tal-LLNA. Il-PS jikkonsistu fil-komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar, is-sustanzi ta' referenza rakkomandati u l-istandards għall-preċiżjoni u l-affidabbiltà li l-metodu propost għandu jilhaq jew jaqbez.
- 1. Komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar**
5. Sabiex jiġi żgurat li metodu tal-LLNA simili jew modifikat huwa analogu b'mod funzjonali u mekkanistiku għal-LLNA u jkejjel l-istess effett bijoloġiku, il-komponenti li ġejjin għandhom jiġu inkluzi fil-protokoll tal-metodu ta' ttestjar:
 - Is-sustanza tat-test għandha tiġi applikata b'mod topiku fuq iż-żewġ widnejn tal-ġurdien,
 - Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel fin-nodi limfatiċi li jkunu qed inixxu mill-post tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,
 - Il-proliferazzjoni tal-limfoċiti għandha titkejjel waqt il-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda,

▼ **M3**

- Għas-sustanzi tat-test, l-ogħla doża magħzula għandha tkun il-konċentrazzjoni massima li ma ttiprovokax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali fil-ġurdien. Għal sustanzi kimiċi ta' referenza pożittivi, bħala minimu, l-ogħla doża għandha tkun għolja daqs il-valuri tal-EC3 (Konċentrazzjoni Stmata 3) tal-LLNA tas-sustanzi kimiċi ta' referenza korrispondenti (ara t-Tabella 1) mingħajr ma tiġi prodotta tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni eċċessiva tal-ġilda lokali tal-ġurdien,
- VC simultanju għandu jiġu inkluż f'kull studju u, fejn xieraq, għandu jintuża PC simultanju wkoll,
- Għandu jintuża minimu ta' erba' annimali għal kull grupp ta' dozi,
- Tista' tingabar dejta individwali jew inkella fi grupp dwar l-annimali.

F'każ li ma jintlahaqx xi wiehed minn dawn il-kriterji, dawn il-PS ma jistgħux jintużaw għall-validazzjoni ta' metodu simili jew modifikat.

II. **Lista minima ta' sustanzi kimiċi ta' referenza**

6. Il-PS (12) armonizzati tal-US-ICCVAM, l-EC-ECVAM u l-JaCVAM-Gappuniż identifikaw 18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw u erba' sustanzi kimiċi ta' referenza fakultattivi (jiġifieri sustanzi li jew iproduċew riżultati pożittivi foloz jew inkella negattivi foloz fl-LLNA, meta mqabbla ma' riżultati fuq il-bnedmin u fuq fniek tal-Indi (B.6, jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13), u għaldaqstant, jipprovdu l-opportunità li tintwera prestazzjoni tajba daqs l-LLNA jew ahjar) li huma inklużi fil-PS tal-LLNA. Il-kriterji tal-għażla għall-identifikazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi kienu:
 - Il-lista ta' referenza tas-sustanzi kimiċi rrapprezentat it-tipi ta' sustanzi tipikament ittestjati għall-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u għall-firxa ta' reazzjonijiet li l-LLNA kapaċi jkejjel jew ibassar,
 - Is-sustanzi kellhom strutturi kimiċi definiti sew,
 - Id-dejta tal-LLNA minn testijiet fuq hnieżer tal-Indi (jiġifieri B.6; il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13) u (fejn possibbli) id-dejta mill-bnedmin kienet disponibbli għal kull sustanza, u
 - Is-sustanzi kienu disponibbli minn sors kummerċjali.

Is-sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati huma elenkati fit-Tabella 1. L-istudji li jużaw is-sustanzi kimiċi ta' referenza proposti għandhom jiġu evalwati fil-mezz li huma elenkati miegħu fit-Tabella 1. Fis-sitwazzjonijiet fejn sustanza elenkata ma tistax tkun disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi oħra li jissodisfaw il-kriterji tal-għażla msemmija, b'ġustifikazzjoni adegwata.

Tabella 1

Sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati għall-ps tal-LLNA

Numru	Sustanzi kimiċi ⁽¹⁾	Nru tal-CAS	Forma	Mezz ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
1	5-Kloro-2-metil-4-isotijażolin-3-on (CMI)/2-metil-4-isotijażolin-3-on (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/ 2682-20-4	Lik	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Fenilendiammina	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Klorur tal-kobalt	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoewġenol	97-54-1	Lik	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Merkaptobenzotijazol	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Ċitral	5392-40-5	Lik	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Lik	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Ewġenol	97-53-0	Lik	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenilbenzoat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alkohol ċinnamiku	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Urea tal-imidazolidinil	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metakrilat tal-metil	80-62-6	Lik	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Klorobenzen	108-90-7	Lik	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Lik	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼ M3

Numru	Sustanzi kimiċi ⁽¹⁾	Nru tal-CAS	Forma	Mezz ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Firxa attwali tal-EC3	LLNA vs. Fenek tal-Indi	LLNA vs. Bniedem
16	Aċidu lattiku	50-21-5	Lik	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilat tal-metil	119-36-8	Lik	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Aċidu saliciliku	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–

Sustanzi fakultattivi sabiex Tintwera Prestazzjoni Mtejbja Relatata mal-LLNA

19	Sodju lauril sulfat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Dimetakrilat tal-etilen glikol	97-90-5	Lik	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Ksilen	1330-20-7	Lik	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/-
22	Klorur tan-nikil	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Taqsiert: AOO = aċetun: żejt taż-zebbuġa (4:1, v/v); Nru tal-CAS = Numru tal-Chemical Abstracts Service; DMF = N,N-dimetilformamid; DMSO = dimetil sulfossidu; DNCB = 2,4-dinitroklorobenzen; EC3 = stima ta' konċentrazzjoni mehtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' 3; GP = riżultat tat-test fuq il-fenek tal-Indi (jiġifieri B. 6 jew il-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (13); HCA = eżil ċinnamaldehyd; Lik = likwida; LLNA = riżultat tal-Analiżi tan-Nodula tal-Limfa Lokali tal-grieden (jiġifieri B. 42 jew il-Linja Gwida 429 tat-Test tal-OECD) (1); MEK = metil etil keton; NA = mhux applikabbli peress li l-indiċi ta' stimolazzjoni huwa ta' < 3; NC = mhux ikkalkolata peress li d-dejta nkisbet minn studju wiehed; Sol = solida; Veh = mezz tat-test.

(*) Ġie supponut li s-sustanza mhijiex sensitizzatur fil-bnedmin minhabba l-fatt li ma nstabu l-ebda riżultati mit-test kliniku bl-impjastri (clinical patch test), mhijiex inkluża bħala allergen fis-sett tat-test bl-impjastri, u ma nstabu l-ebda rapporti ta' każijiet ta' sensitizzazzjoni fil-bnedmin.

(**) Mhijiex disponibbli d-dejta mill-GP (fenek tal-Indi).

⁽¹⁾ Is-sustanzi kimiċi għandhom jittejjew ta' kuljum sakemm id-dejta ta' stabbiltà ma turix l-aċċettabilità tal-hżin.

⁽²⁾ Minhabba l-impatt potenzjali ta' mezzi differenti fuq il-prestazzjoni tal-LLNA, għandu jintuża l-mezz rakkomandat għal kull sustanza kimika ta' referenza (24) (32).

⁽³⁾ Il-valur medju fejn kien hemm disponibbli aktar minn valur wiehed tal-EC3. Għal sustanzi negattivi (jiġifieri bl-indiċi ta' stimolazzjoni < 3), hija pprovduta l-ogħla konċentrazzjoni ttestjata.

⁽⁴⁾ Għadd ta' studji tal-LLNA li minnhom inkisbet id-dejta.

⁽⁵⁾ Kummerċjalment disponibbli bħala Kathon CG (Nru tal-CAS 55965-84-9), li hija tahlita ta' 3:1 ta' CMI u MI. Il-konċentrazzjonijiet relattivi ta' kull firxa ta' komponenti minn 1,1 % sa 1,25 % (CMI) u 0,3 % sa 0,45 % (MI). Il-komponenti inattivi huma sustanzi tal-melh tal-manjeżju (21,5 % sa 24 %) u nitrat tar-ram (0,15 % sa 0,17 %), bil-formulazzjoni li jifdal ta' 74 % sa 77 % ilma. Kathon CG hija disponibbli minnufih mingħand Sigma-Aldrich u Rohm and Haas (issa, Dow Chemical Corporation).

▼ M3

III. Standards ta' affidabbiltà u preċiżjoni ddefiniti

7. Il-preċiżjoni ta' metodu LLNA simili jew modifikat għandha tissodisfa jew taqbeż dik tal-PS tal-LLNA meta dan jiġi evalwat permezz tat-18-il sustanza kimika ta' referenza minimi li għandhom jintużaw. Il-metodu l-ġdid jew modifikat għandu jirriżulta fil-klassifikazzjoni korretta fuq il-bażi ta' deċiżjoni ta' "iva jew le". Madankollu, il-metodu l-ġdid jew modifikat jista' ma jikklassifikax b'mod korrett is-sustanzi kimiċi ta' referenza minimi kollha li għandhom jintużaw. Jekk, pereżempju, wiehed mis-sensitizzaturi dgħajfa jiġi kklassifikat hażin, tista' titqies raġuni għall-klassifikazzjoni żbaljata u dejta addizzjonali adattata (pereżempju riżultati tat-test li jipprovdu klassifikazzjonijiet korretti għal sustanzi ohra b'karatteristiċi fiżiċi, kimiċi u sensitizzanti simili għal dawg tas-sustanza kimika ta' referenza klassifikata hażin) sabiex tintwera prestazzjoni ekwivalenti. F'dawn iċ-ċirkostanzi, l-istatus ta' validazzjoni tal-metodu ta' ttestjar LLNA l-ġdid jew modifikat jiġi evalwat każ b'każ.

Riproduċibbiltà intralaboratorja

8. Sabiex tiġi stabbilita r-riproduċibbiltà intralaboratorja, metodu LLNA ġdid jew modifikat għandu jiġi eżaminat billi tintuża sustanza sensitizzanti li hija karatterizzata sew fl-LLNA. Għaldaqstant, il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet ripetuti ta' eżil ċinnamaldeid (HCA). Sabiex tiġi eżaminata l-affidabbiltà intralaboratorja, il-limitu stmat ta' konċentrazzjoni (EC_t – threshold Estimated Concentration) għall-HCA għandhom jingiebu minn erba' okkażjonijiet separati tal-inqas b'gimgha bejn it-testijiet. Riproduċibbiltà intralaboratorja aċċettabbli hija indikata mill-abbiltà tal-laboratorju li f'kull test tal-HCA jikseb il-valuri tal-EC_t ta' bejn 5 % u 20 %, li jirrappreżentaw il-firxa ta' 0,5-2,0 darbiet l-EC₃ medja speċifikata għall-HCA (10 %) fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

Riproduċibbiltà interlaboratorja

9. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja ta' metodu LLNA ġdid jew modifikat għandha tiġi eżaminata billi jintużaw żewġ sustanzi sensitizzanti li huma karatterizzati sew fl-LLNA. Il-PS tal-LLNA huma bbażati fuq il-varjabbiltà tar-riżultati minn testijiet tal-HCA u 2,4-dinitroklorobenżen (DNCB) fl-laboratorji differenti. Il-valuri tal-EC_t għandhom jingiebu b'mod indipendenti minn studju wiehed imwettaq tal-inqas fi tliet laboratorji separati. Sabiex tintwera r-riproduċibbiltà interlaboratorja aċċettabbli, kull laboratorju għandu jikseb il-valuri tal-EC_t ta' 5 % sa 20 % għall-HCA u ta' 0,025 % sa 0,1 % għad-DNCB, li jirrappreżentaw il-medja ta' 0,5-2,0 darbiet il-konċentrazzjonijiet medji tal-EC₃ speċifikati għall-HCA (10 %) u d-DNCB (0,05 %), rispettivament, fl-LLNA (ara t-Tabella 1).

▼ M3

Appendiċi 2

Definizzjonijiet

Preciżjoni: Il-vicinanza tal-qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija miżura ta' prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u aspett wiehed ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (14).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Limitu stmat ta' konċentrazzjoni (EC₅₀): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni li huwa indikattiv ta' rispons pożittiv.

Konċentrazzjoni stmata ta' tlieta (EC₃): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' tlieta.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata hażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata hażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl sa fejn il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hija ddeterminata matul il-proċessi ta' validazzjoni u ta' validazzjoni minn qabel, u tindika sa fejn test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u tissejjah ukoll riproduttibilità bejn laboratorji (14).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi hdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjah ukoll riproduttibilità fi hdan il-laboratorju (14).

Test "me-too": Espressjoni li tingħad fit-taħdit komuni għal metodu ta' ttestjar li huwa strutturalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' referenza validat u aċċettat. Metodu ta' ttestjar bħal dan ikun kandidat għal validazzjoni rapida ("catch-up validation"). Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili (14).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħra f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Standards ta' Prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdu bażi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li huwa simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inkluzi: (i) komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati sabiex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' preciżjoni u affidabbiltà, ibbażati fuq x'inkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta jiġi evalwat billi tintuża l-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (14).

Metodu ta' ttestjar ta' speċjalità: Metodu ta' ttestjar li l-manifattura u d-distribuzzjoni tiegħu huma ristretti minn privattivi, drittijiet tal-awtur, marki kummerċjali, eċċ.

▼ M3

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li skontu jiġu vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiziti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Sustanzi kimiċi ta' referenza: Sustanzi kimiċi magħżula għall-użu fil-proċess ta' validazzjoni, li għalihom huma diġà magħrufa r-reazzjonijiet fis-sistema ta' ttestjar ta' referenza *in vitro* jew *in vivo* jew l-ispeċi ta' interess. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom ikunu rappreżentanti tal-klassijiet ta' sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni jintuża l-metodu ta' ttestjar, u dawn għandhom jirrap-prezentaw il-firxa shiħa ta' reazzjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mis-sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni li jintuża dan il-metodu ta' ttestjar, minn qawwija, għal dgħajfa, sa negattivi. Settijiet differenti ta' sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa għall-istadji differenti tal-proċess ta' validazzjoni, u għal metodi ta' ttestjar u użi tat-testijiet differenti (14).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-konsiderazzjoni tal-preċiżjon (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (14).

Affidabbiltà: Kejl li jiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fi hdan u bejn il-laboratorji maż-żmien, meta dan jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hija eżaminata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà intralaboratorja u dik interlaboratorja (14).

Sensitizzazzjoni tal-gilda: Proċess immunoloġiku li jitfaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allergen kimiku induttur, li jipprovoka rispons immuni fil-gilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jeżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-gilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dik fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li hija msemmija wkoll sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih tlestew studji ta' validazzjoni sabiex jiġu ddeterminati r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabbiltà għal skop speċifiku. Huwa importanti li jiġi osservat li metodu ta' ttestjar validat jista' ma jkollux prestazzjoni suffiċjenti f'termini ta' preċiżjoni u affidabbiltà sabiex jitqies aċċettabbli għall-iskop propost (14).

▼B**B.43. STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSIČITÀ FL-ANIMALI GERRIEMA****1. METODU**

Dan il-metodu huwa ekwivalenti għal OECD TG 424 (1997)

Dan il-Metodu tat-test kien ġie ddisinjat sabiex jakkwista l-informazzjoni meħtieġa halli jikkonferma jew aktar jikkarakterizza l-potenzal tan-newrotossicità ta' kimika f'annimali adulti. Jista' jkun jew imwettaq flimkien mal-Metodi tat-Test eżistenti dwar l-istudji tat-tossicità għal doża repetuta jew li jkun imwettaq bħala studju separat. Huwa rakkommandat li il-OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) jkun ikkonsultat sabiex jgħin fid-disinn ta' l-istudji bbażati fuq dan il-metodu ta' Test. Dan huwa partikolarment importanti meta modifika ta' l-osservazzjonijiet u tal-proċeduri tat-test kif rakkommandat għall-użu b'rutina ta' dan il-metodu jkunu kkonsidrati. Id-Dokument ta' Gwida kien ġie ippreparat sabiex jiffaċilita l-għażla ta' proċeduri oħrajn tat-test għall-użu f'ċirkostanzi speċifiċi.

L-assess ta' l-iżvilupp newrotossiku mhux is-suġġett ta' dan il-Metodu.

1.1 INTRODUZZJONI

Fl-assess u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tal-kimika, huwa importanti li jkun ikkonsidrat il-potenzal ta' l-effetti newrotossici. Diga fil-Metodu tat-test dwar tossicità sistematika għal doża repetuta, jinkludi osservazzjonijiet li jharsu dwar in-newrotossicità potenzali. Dan il-Metodu ta' Test jista' jkun użat dabiex jiddisinja studju halli jakkwista aktar informazzjoni dwar, jew jikkonferma, l-effetti newrotossici, osservati fl-istudji tat-tossicità sistematika f'doża repetuta. B'dana kollu, kunsiderazzjoni dwar in-newrotossicità potenzali ta' klassijiet ta' kimika jistgħu jissuġġerixxu li dawn jistgħu ikunu evalwati aħjar bl-użu ta' dan il-metodu mingħajr indikazzjonijiet preċedenti tan-newrotossicità potenzali minn studji tat-tossicità sistematika minn doża repetuta. Uħud mill-kunsiderazzjonijiet jinkludu, per eżempju:

— l-osservazzjoni ta' sinjali newroloġiċi jew feriti newropatoloġiċi fl-istudji tossiċi apparti milli l-istudji tat-tossicità sustematika f'doża repetuta, jew

— relazzjoni strutturali jew informazzjoni oħra li torbothom ma newrotossikanti magħrufa.

B'zieda jista' jkun hemm okkażjonijiet oħrajn meta l-użu ta' dan il-metodu ta' test jista' jkun xieraq; għal aktar dettalji ara (1).

Dan il-Metodu kien ġie żviluppat sabiex ikun jista' jiġi mfassal halli jilhaq il-htigiet partikolari sabiex jikkonferma l-histopatoloġija speċifika u n-newrotossicità ta' l-imġieba ta' kimika kif ukoll jipprovi karatterizzazzjoni u kwantifikazzjoni tar-reazzjonijiet newrotossici.

▼B

Fil-passat, in-newrotossicità kienet imqabbla man-newropatija li tinvolvi feriti newropatoloġiċi jew disfunzjonijiet newroloġiċi, bħala ma huma attakk ta' puplesija, paralizi jew roda. Ghalkemm in-newropatija hija manifestazzjoni importanti tan-newrotossicità, issa huwa ċar li hemm hafna sinjali oħrajn tat-tossicità tas-sistema nervuża (eż. it-telf tal-kordinament muturili, it-tnaqqis sensorju, id-disfunzjonijiet fil-tghallim u l-memorja) li jistgħu ma jkunux riflessi fl-istudji newropatiċi jew ta' tipi oħrajn.

Dan il-Metodu ta' Test newrotossiku huwa iddisinjat sabiex jiżvela newro-imġieba maġġuri u l-effetti newropatoloġiċi f'annimali gerriema adulti. Waqt l-effetti ta' l-imġieba, anki fin-nuqqas ta' tibdiliet morfoloġiċi, jistgħu jirreflettu fuq l-impatt hażin ta' l-organizmi, mhux it-tibdiliet ta' l-imġieba kollha huma speċifiċi għas-sistema nervuża. Għalhekk, xi tibdiliet osservati għandhom ikunu evalwati b'konnessjoni mad-dettalji histopatoloġiċi, hematoloġiċi jew biokemikali korrelattivi kif ukoll l-informazzjoni dwar tipi oħrajn tat-tossicità sistematika. It-testijiet mehtieġa b'dan il-metodu sabiex jipprovdur karatterizzazzjoni u kwantifikazzjoni tar-reazzjonijiet newrotossici jinkludu proċeduri histopatoloġiċi jew ta' l-imġieba speċifiċi li jitgħu aktar ikunu appoġġjati minn investigazzjonijiet elettrofizjoloġiċi u/jew biokimiċi (1) (2) (3) (4).

In-newrotossikanti jistgħu jaġixxu fuq numru ta' miri fi ħdan is-sistema nervuża u b'varjetà ta' mekkanizmi. La darba l-ebda medda ta' testijiet ma hija kapaċi li tassessja fil-profond il-potenzal newrotossiku tas-sustanzi kollha, jista' jkun mehtieġ li jkunu utilizzati testijiet *in vivo* jew *in vitro* oħrajn speċifiċi għat-tip tan-bewrotossicità osservata jew anticipata.

Dan il-Metodu tat-Test jista' jkun użat ukoll, b'konnessjoni mal-gwida stabbilita fid-Dokument ta' Gwida OECD dwar l-Istrateġiji u l-Metodi tat-testijiet Newrotossici (1) li huma iddisinjati bħala intizi li aktar jikkaratterizzaw jew iżidu s-sensittività tal-kwantifikazzjoni tar-reazzjoni tad-doża sabiex ikun hemm estimi ahjar tal-livell ta' l-effet mhux-osservat-ħażin jew li jissustanzja perikoli magġrufa jew issuspetati tal-kimika. Per eżempju, l-istudji jistgħu ikunu iddisinjati li jidentifikaw u jevaljaw il-mekkanizmi newrotossici jew li jissupplementaw l-informazzjoni diġa disponibbli mill-użu tal-proċeduri bażiċi fl-osservazzjoni newro-imġieba u newropatoloġiċi. Tali studji mhux bilfors li jiddupplikaw l-informazzjoni li tkun giet ġenerata mill-użu tal-proċeduri normali rakkommandati f'dan il-metodu jekk tali dettalji jkunu diġa disponibbli u li ma humiex meqjusa bħala mehtieġa għall-interpretazzjoni tar-rizultati ta' l-istudju.

Dan l-istudju newrotossiku, meta użat waħdu jew flimkien ma oħrajn, jipprovdur informazzjoni li tista':

- tidentifika jekk is-sistema nervuża tkun affettwata b'mod permanenti jew reversibbli mill-kimika ittestjata;
- tikkontiribwixxi l-karatterizzazzjoni tat-tibdiliet fis-sistema nervuża assoċjati ma l-espożizzjoni lejn il-kimika, u dwar ir-rikonoxximent tal-mekkanizmu bażiku;

▼B

— tiddetermina ir-relazzjoni tad-doża u tar-reazzjoni tal-hin sabiex ikun ikkalkolat il-livell ta' l-effett hażin mhux-osservat (li jista' jkun użat sabiex jista' b'bilixxi kriterja b'sigurtà għall-kimika).

Dan il-Metodu ta' Test juża amministrazzjoni orali tas-sustanza tat-test. Rotot ohrajn ta' l-amministrazzjoni (eż. dermal jew man-nifs) jistgħu ikunu aktar xierqa, u jistgħu jehtiegu modifika għall-proċessi rakkommandati. Konsiderazzjonijiet ta' l-għażla tar-rotta ta' l-amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-profil ta' l-espożizzjoni umana u l-informazzjoni disponibbli, tossikoloġika jew kinetika.

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Effett hażin: Kwalunkwe alterazzjoni relatata mat-trattament minn linja bazi li tnaqqas l-abbiltà ta' l-organizmu li jibqa' ħaj, li jirri-produci jew li jadatta għall-ambjent.

Doża: Hija l-ammont tas-sustanza tat-test kif somministrata. Id-doża hija espressa bħala piż (g. Mg) jew bħala piż tas-sustanza tat-test għal kul unità tal-piż ta' l-animall tat-test (eż. mg/Kg), jew bħala konċentrazzjonijiet dietarju kostanti 9ppm).

Dożaġġ: Huwa terminu ġenerali li jinkluzi d-doża, il-frekwenza tagħha u t-tul taż-żmien tad-dożaġġ.

Newrotossicità: Hija it-tibdil hażin fl-istruttura jew fil-funzjoni tas-sistema nervuża li tirriżulta minn espożizzjoni lejn aġent kimiku, bioloġiku jew fiżiku.

Newrotassikant: Huwa l-aġent kimiku, bioloġiku jew fiżiku li jkollu l-potenzal li jgħallq in-newrotossicità.

NOAEL: Hija l-abbrevjazzjoni għall-livell ta' l-ebda effett avvers ma huwa osservabbli (no-observed-adverse-effect level) u hija l-għola doża jew livell ta' espożizzjoni meta l-ebda sejbiet avversi relatati mat-trattament ma jkunu osservati.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-kimika tat-test hija somministrata bir-rotta orali matul medda ta' dozi lil diversi gruppi ta' animali gerriema tal-laboratorju. Dozi repetuti huma normalment mahtieġa, u r-regola tad-dożaġġ tista' tkun 18 jum, subkronika (90 jum) jew kronika (sena jew aktar). Il-proċeduri stabbiliti f'dan il-Metodu ta' test jistgħu wkoll ikunu użati għall-istudju tan-newrotossicità akuta. L-animalli huma ittestjati sabiex jippermettu s-sejbien jew il-karatterizzazzjoni ta' l-imġieba u/jew l-anormalitajiet newroloġiċi. Medda ta' mġieba li tista' tkun affettwata bin-newrotossikanti hija assessjata matul kull perjodu ta' l-osservazzjoni. Fl-aħhar tat-test, subset ta' animalli ta' kull sess minn kull grupp huma mxerrda *in situ* u s-sezzjonijiet tal-moħħ, l-ispina dorsali, u n-nervi periferali huma ippreparati u eżaminati.

Meta l-istudju jkun imwettaq bħala studju indipendenti sabiex jevalwa n-newrotossicità jew li jikkarakterizza l-effetti newrotossici, l-animalli f'kull grupp ma li jkunux użati għat-tixrid u l-histopatoloġija sussegwenti 9 ara t-Tabella 1) jista' jkun użat għall-proċeduri newro-imġieba speċifika, n-newropatoloġija, in-newrokimika jew elettrofizjoloġiċi li jistgħu jissupplementaw l-informazzjoni akkwistat mill-eżaminazzjonijiet normali mehtieġa b'daan il-Metodu (1). Dawn il-proċeduri supplementari jistgħu ikunu partikolarment utili meta l-osservazzjonijiet empiriċi jew l-effetti mistennija jindikaw tip jew mira speċifika tan-newrotossicità ta' kimika. B'mod alternattiv, il-kumplement ta' l-animalli jistgħu ikunu użati għal evalwazzjonijiet bħal daww mitluba fil-Metodi tat-testijiet għal studji tat-tossicità f'doża repetuta fl-animalli gerriema.

▼B

Meta l-proċeduri ta' dan il-Metodu ta' Test huma miġbura ma dawk tal-metodi ta' testijiet oħrajn, numru suffiċċjenti ta' annimali huwa mehtieġ sabiex jissodisfa l-htigiet għall-osservazzjonijiet taż-żewġ studji.

1.4 ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 L-għażla ta' l-ispeċje ta' l-annimali

L-ispeċje preferuta ta' l-annimali gerriema huwa l-far, għalkemm speċje oħrajn ta' annimali gerriema tista' tkun użata. Annimali żgħażaġh adulti u b'saħħithom tas-siltiet normalment użati fil-laboratorju għandhom ikunu utilizzati. Il-femminili għandhom ikunu tali li qatt ma jkunu weldu u ma jkunux tqal. Id-dozaġġ għandu normalment jibda malajr kemm jista' jkun possibbli wara l-ftim, preferibbilment mhux aktar tard minn meta l-annimali jkollhom sitt ġimghat, u, fi kwalunkwe każ, qabel ma l-annimali jkunu għalqu d-disa' ġimghat. B'dana kollu, meta dan l-istudju jsehh flimkien ma studji oħrajn, din il-htieġa ta' l-età tista' tkun tehtieġ aġġustament. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni fil-piż ta' l-annimali użati għandha tkun minima u ma teċċedix 20 % tal-piż medju ta' kull sess. Meta studju ta' doża repetita ftul qasir ta' żmien ikun imwettaq bħala preliminarju għal studju f'terminu fit-tul, l-annimali mill-istess tiġ u sorsi għandhom ikunu użati fiż-żewġ studji.

1.4.2 Il-kundizzjonijiet tal-gaġġeġ u ta' l-ghalf

It-temperatura tal-kamra ta' l-annimali esperimentali għandha tkun 22 °C (± 3 °C). Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-anqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % apparti milli waqt it-tindif tal-kamra, l-ghan għandu jkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, is-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Hsejjes għoljin intermittenti għandhom jinżammu għall-anqas possibbli. Għall-ghalf, id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju jistghu ikunu użati b'forniment minghajr limitu ta' ilma tax-xorb. L-għażla tad-dieta tista' tkun influwenzata bil-htieġa li tkun assigurata inter-tahlita xierqa tas-sustanza tat-test meta somministrata b'dan il-metodu. L-annimali jistghu jinżammu individwalment jew li jkunu f'gaġġa bħala grupp żgħir ta' l-istess sess.

1.4.3 Preparazzjoni ta' l-annimali

Annimali żgħażaġh b'saħħithom ikunu assenjati kif jinzerta għal gruppi ta' trattament u tal-kontroll. Il-gaġġeġ għandhom ikunu irrangati b'tali mod li l-effetti possibbli minhabba t-tqeghid fil-gaġġeġ ikunu minimizzati. L-annimali huma identifikati b'mod uniku u miżmuma fil-gaġġeġ tagħhom għal mill-anqas (5) hamest ijiem qabel il-bidu ta' l-istudju sabiex jippermetti għall-akklamitizzazzjoni lejn il-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

1.4.4 Rotta ta' l-amministrazzjoni u l-preparazzjoni tad-dożi

Dan il-Metodu ta' Test juża amministrazzjoni orali tas-sustanza tat-test. L-amministrazzjoni orali tista' tkun bi tmieġh sfurzat, ma l-ikel, jew fl-ilma tax-xorb, jew b'kapsuli. Rotot oħrajn ta' l-amministrazzjoni (eż. dermal jew man-nifs) jistghu ikunu aktar xierqa, u jistghu jehtieġu modifika għall-proċessi rakkommandati. Konsiderazzjonijiet ta' l-għażla tar-rota ta' l-amministrazzjoni jkunu jiddependu mill-profil ta' l-espożizzjoni umana u l-informazzjoni disponibbli, tossikologika jew kinetika. Ir-raġġunar għall-għażla tar-rota ta' l-amministrazzjoni kif ukoll il-modifiki li jirriżultaw għall-proċeduri ta' dan il-metodu ta' test għandhom ikun indikati.

▼B

Meta mehtieg, is-sustanza tat-test tkun imdewwba jew sospiża f'mezz xieraq. Huwa rakkommandat li, kull meta possibbli, l-użu ta' tahlita/sospensjoni akwea tkun meqjusa b'hala l-ewwel ghażla, sewgeita bil-kunsiderazzjoni ta' tahlita/emulsjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamhirrum) w imbagħad b'xi tahlita ohra f'mezzi oħrajn. Il-karatteristiċi tossiċi tal-mezz għandhom ikun u magħrufa. B'żieda, kunsiderazzjoni għandha tingħata għal dawn il-karatteristiċi li ġejjin dwar il-mezz: l-effetti fuq l-assorbazzjoni, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu, u ż-żamma jew it-twarrib tas-sustanza tat-test; l-effetti tal-propjetajiet kimiċi tas-sustanza tat-test li jistgħu johlqu bidla fil-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' l-ikel u l-ima jew ta' l-istat nutrizzjonali ta' l-annimali.

1.5 PROCEDURE

1.5.1 Numru u sess ta' l-annimali

Meta l-istudju jkun imwettaq b'hala studju separat, mill-anqas 20 annimal (10 nisa u 10 irġiel) għandhom ikunu użati għal kull grupp tad-doża u tal-kontroll għall-evalwazzjoni ta' l-osservazzjonijiet dettaljati kliniċi u funzjonali. Mill-anqas hamest irġiel u hames nisa, magħżula minn dawk l-10 tirġiel u l-ghaxar nisa, għandhom ikunu mxerrda *in situ* u użati għall-newrohistopatoloġija dettaljata fit-tmien ta' l-istudju. Fil-kazi meta numru limitat biss ta' annimali jkunu mogħti d-doża fil-grupp osservat għas-sinjali ta' l-effetti newrotossiċi, kunsiderazzjoni għandha tkun mogħtija għall-inkluzjoni ta' dawn l-annimali f'dawk magħżula għat-tixrid. Meta l-istudju jkun imwettaq flimien ma l-istudju tat-tossiċità ta' doża repetuta, numru adegwat ta' annimali għandu jkun użat sabiex jilhaq l-ghanijiet taż-żewġ studji. In-numru minimu ta' annimali f'kull grupp għad-diversi ġemgħat ta' studji huwa mogħti fit-tabella 1. Jekk sa dan it-tant ikun hemm qtil jew gruppi ta' rkupru għall-osservazzjoni tar-riversabbiltà, l-persistenza jew l-okkorrenza mdewma ta' l-effetti tossiċi ta' wara t-trattament, ikunu ippanati jew meta osservazzjonijiet supplementari jkunu ikkunsidrati, allura n-numru ta' l-annimali għandu jkun miżjud sabiex jassigura li n-numru ta' l-anniamli mehtieġa għall-osservazzjoni u l-histopatoloġija jkunu disponibbli.

1.5.2 Grupp ta' trattament u tal-kontroll

Mill-anqas tlett gruppi ta' doża u grupp tal-kontroll għandhom ġeneralment ikunu użati, imma jekk mill-assessjar ta' informazzjoni ohra, l-ebda effetti ma jkunu mistennija fid-doża repetuta ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum, tast ta' limitu jkunu jkun imwettaq. Jekk ma jkun hemm l-ebda informazzjoni disponibbli, medda ta' studju tas-sejbien tista' tkun imwettqa sabiex tgħin fid-determinazzjoni tad-dozi li għandhom ikunu użati. Apparti milli għat-trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom ukoll ikunu mqandla b'manjera identika għas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk ikun użat mezz, il-grupp tal-kontroll għandu jirċievi il-mezz fl-ghola volum użat.

1.5.3 Verifika ta' l-affidabbiltà

Il-laboratorju li jwettaq l-istudju għandu jipprezenta informazzjoni li turi il-kapaċità tiegħu li jwettaq l-istudju u s-sensittività tal-proċeduri użati. Tali informazzjoni għandha tipprovdi evidenza ta' l-abbiltà li jiżvela u jikkwantifika, kif xieraq, tibdiliet fl-ghanijiet finali differenti kif rakkommandati għall-osservazzjoni, bħal ma huma sinjali awtomatiki, reattività sensorja, is-saħħa tal-qabda fid-dirgħajn u s-saqajn u l-attività motorili. L-informazzjoni dwar il-kimika li tikkawża tipi differenti ta' reazzjonijiet newrotossiċi u jistgħu ikunu użati b'hala kontroll pożittiv tas-sustanzi jista' jinstgħab fir-referenzi 2 sa 9. L-informazzjoni storika tista' tkun użata jekk l-aspetti essenzjali tal-proċeduri. Sperimentali jibqgħu l-istess. Aġġornament perijodiku ta' l-informazzjoni storika huwa rakkommandat. Informazzjoni ġdida li turi s-sensittività kontinwa tal-proċeduri għandha tkun żviluppata meta uhud mill-elementi essenzjali ta' l-imġieba tat-test jew tal-proċeduri tkun ġiet mibdula mill-laboratorju li jwettaq l-istudju.



1.5.4

L-ghażla tad-doża

Il-livelli tad-doża għandhom ikunu magħżula billi tkun meqjusa xi informazzjoni preċedentament osservata tat-tossicità u l-kinetika disponibbli għall-kompost tat-test jew tal-materjali relatati. L-ghola livell tad-doża għandu jkun magħżul bil-ghan li jinduci effetti newrotossici jew effetti ċari sistematikament tossici. Sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża għandha tkun magħżulha bil-ghan li turi kwalunkwe reazzjoni relatata mad-doża u l-livell ta' l-ebda effett hażin mhu osservat (NOAEL). Bħala prinċipju, il-livelli tad-doża għandhom ikunu hekk stabbiliti sabiex primarjament l-effetti tossici fuq is-sistema nervuża jistghu ikunu distingwiti mill-effetti relatati mat-tossicità sistematika. Tnejn sa erba' intervalli huma ta' spiss ottimi sabiex ikunu stabbiliti l-livelli tad-doża dixxendenti, u ż-żieda tar-raba' grupp tat-test hija ta' spiss preferibbli mill-użu ta' intervalli ferm twal (eż. aktar minn fattur ta' 10) bejn id-doži. Meta jkun hemm estimi raġjonevoli ta' espożizzjoni umana, dan għandu jkun meqjus.

1.5.5

Test tal-limitu

Jekk l-istudju fl-livell ta' doża ta' mill-anqas 1 000 mg/kg piż tal-gisem.kull jum, li juża l-proċeduri deskritti, ma jipproduci l-ebda effetti newrotossici u jekk it-tossicità ma tkunx mistennija meta ibbażata fuq l-informazzjoni mill-komposti strutturament relatati, allura studju shih li juża tlett livelli ta' doži jista' li ma jkunx meqjus bħala mehtieg. L-isposizzjoni umana mistennija tista' tindika il-htieġa għal-livell ta' doża orali għola li tkun użata fit-test tal-limitu. Għal tipi oħrajn ta' l-amministrazzjoni, bħal ma hija l-applikazzjoni man-nifs jew dermali, il-propjetajiet fiżiko-kimiċi tas-sustanza tat-test, bħal kemm tinhall, ta' spiss tista' tindika u tillimita l-livell massimu attenibbli ta' l-espożizzjoni. Għat-twertieq ta' studju akut orali, id-doża tat-test tal-limitu għandha tkun ma mill-anqas 2 000 mg/kg.

1.5.6

Amministrazzjoni tad-doži

L-annimali huma mogħtija d-doża bis-sustanza tat-test, ta' kull jum, sebat ijiet kull ġimgħa, għal perjodu ta' mill-anqas 28 jum; l-użu tar-regola tad-doża ta' hamest ijiem jew perjodu ta' espożizzjoni aqsar, jehtieg li jkunu ġustifikati. Is-sustanza tat-test hija somministrata f'doża wahda b'mod sfurzat bl-użu ta' tubu sa l-istonku jew b'xi inubazzjoni canula xierqa. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jkun amministrat f'waqt wiehed ikun jiddependi mid-daqs ta' l-annimal tat-test. Il-volum m'għandux jeċċedi 1 ml/100 g piż tal-gisem. b'dana kollu fil-każ ta' tahlitiet akweji, 2 ml/100 g tal-piż tal-gisem jista' jkun ikkonsidrat. Apparti milli għal sustanzi irritanti jew korrossivi, li normalment ikununjizvelaw effetti eżasperanti b'konċentrazzjonijiet għola, varjabbilità fil-volum tat-test għandha tkun minimizzata bl-aġġustament tal-konċentrazzjoni sabiex tassigura volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

Għal sustanzi amministrati permezz ta' l-ikel jew ta' l-ilma tax-xorb, huwa importanti li jkun assigurat li l-kwantitajiet tas-sustanza tat-test kif involuti ma jkunux jinterferixxu man-nutrimient normali jew mal-bilanċ ta' l-ilma. Meta s-sustanza tat-test tkun somministrata fid-dieta, konċentrazzjoni djetarja kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-gisem ta' l-annimal, jista' jkun użat; il-mod alternattiv użat għandu jkun speċifikat. Għal sustanza somministrata bi tmieġh sfurzat, id-doża għandha tkun mogħtija f'hinijiet simili ta' kull jum, u aġġustata mill-anqas darba fil-ġimgħa sabiex jinżamm livell kostanti ta' doża f'termini tal-piż tal-gisem ta' l-annimal. Meta l-istudju tad-doża repetuta ikun użat bħala preliminarju għal studju f'terminu fit-tul, dieta simili għandha tkun użata fiż-żewġ studji. F'ċirkostanzi mhuix tas-solti li fihom doża wahda ma tkunx possibbli, id-doża tista' tingħata fi frazzjonijiet iżgħar matul perjodu li ma jeċċedix l-24 siegħa.

▼B

1.6 OSSERVAZZJONIJIET

1.6.1 **Frekwenza ta' l-osservazzjonijiet u t-testijiet**

Fi studji ta' doza repetuta, il-perjodu ta' l-osservazzjoni għandu jkopri l-perjodu tad-dożaġġ. Fi studju akuti, perjodu ta' 14-il jum post-trattament, għandu jkun osservat. Għall-annimali fi gruppi satelliti li huma miżmuma mingħajr espożizzjoni matul perjodu tal-post-trattament, l-osservazzjonijiet għandhom ikopru wkoll dan il-perjodu.

L-osservazzjonijiet għandhom isiru fi frekwenza suffiċjenti sabiex iqawwu l-probabbiltà tas-sejbien ta' xi annormalitajiet fl-imġieba u/jew fin-newroloġija. L-osservazzjonijiet għandhom, preferibbilment, isiru fl-istess hinijiet ta' kull jum b'kunsiderazzjoni mogħtija għall-perjodu l-aktar qawwi ta' l-effetti antiċipati wara d-dożaġġ. Il-frekwenza ta' l-osservazzjonijiet kliniċi u tat-testijiet funzjonali huma miġbura f'sommarju fit-Tabella 2. Jekk informazzjoni kinetika jew informazzjoni oħra minn studji preċedenti tindika il-htieġa ta' l-użu ta' punti differenti tal-hon, it-testijiet jew il-perjodu post-osservazzjoni, skeda alternattiva għandha tkun adotta sabiex tkun akkwistata l-informazzjoni massima. Ir-raġunar għal tibdil ta' l-iskeda għandu jkun ipprovdut.

1.6.1.1 *Osservazzjonijiet dwar il-kundizzjonijiet generali tas-saħħa u tal-mortalità/morbidità*

L-annimali kollha għandhom ikunu osservati bir-reqqa mill-anqas darba kull jum fir-rigward tal-kundizzjoni tas-saħħa tagħhom kif ukoll mill-anqas darbtejn kull jum dwar il-morbidità u l-mortalità.

1.6.1.2 *Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati*

Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati għandhom isiru fuq l-annimali kollha magħżula għal dan l-iskop (ara t-Tabella 1), darba qabel l-ewwel espożizzjoni (sabiex jippermetti għal paraguni fi hdan is-suġġett), u f'hinijiet differenti minn hemm il-quddiem, jiddependi mit-tul ta' l-istudju (ara t-Tabella 2). Osservazzjoni kliniċi dettaljati fuq gruppi satelliti ta' l-irkupru għandhom isiru fit-tmiem tal-perjodu ta' l-irkupru. Osservazzjoni kliniċi dettaljati għandhom isiru il-barra mill-gaġġa ta' fejn jinżammu f'arena normali. Dawn għandhom ikunu reġistrati bir-reqqa bl-użu ta' sistemi tal-marki li jinkludi kriterja jew skali tal-marki għal kull kejl fl-osservazzjonijiet. Il-kriterja jew l-iskali użati għandhom ikunu spjiċċitament definiti mil-laboratorju tat-test. Sforz għandu jsir sabiex jassigura li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test ikunu minimi (mhux sistematikament relatati mat-trattament) u li l-osservazzjonijiet ikunu mwettqa minn osservaturi mharrġa li ma jkunx konxi bit-trattament attwali.

Huwa rakkommandat li l-osservazzjonijiet ikunu mwettqa f'għamla strutturali li fiha kriterja ben definita (inkluża d-definizzjoni tal-“medda” normali) ikunu sistematikament applikati ma kull annimal fuq waqt ta' l-osservazzjon. Il-“medda normali” għandha tkun adegwatament dokumentata. Is-sinjali osservati kollha għandhom ikunu reġistrati. Kull meta prattikabbli, il-magnitudini tas-sinjali osservati għandhom ukoll ikunu rekordjati. L-osservazzjonijiet kliniċi għandhom jinkludu, imma ma jkunx limitati għall-ambjament fil-gilda, fis-suf, fl-ghajnejn, fil-membrani mukożi, fl-okkorrenza tas-sekrazzjonijiet u tal-hmieġ u l-attività awtomatika

▼B

(eż. lakrimazzjoni, piloerezzjoni, id-daqs tal-pupilla, għamla repiratorja mhux normali u/jew in-nifs mill-halq, xi sinjali mhux tas-soltu ta' l-urina jew tal-qlaet, u urina b'kulur stramb). Xi reazzjonijiet mhux tas-soltu fir-rigward tal-pożizzjoni tal-ġisem, il-livell ta' l-attività (eż. tnaqqis jew żieda fl-esplorazzjoni fl-arena normali) u l-kordinament tal-moviment, għandhom ukoll ikunu innotati. Tibdil fil-mixi (eż. xengil, atassja), il-posizzjoni (eż. b'darhom mgħawweġ) u r-reattività għat-tqandil, it-tqegħid jew stimulu ambjentali ohraajn, kif ukoll il-preżenta ta' movimenti kloniċi jew toniċi, konvulżjonijiet jew roghda, stereotipi (eż. kura żejda, movimenti mhux normali tar-ras, dawrien repetittivi) jew imġieba stramba (eż. gdim jew li jilgħaqu b'mod eċċessiv, mutilazzjoni tagħhom stess, mixi lura, vokalizzazzjoni) jew aggressjoni għandhom ikunu rekordjati.

1.6.1.3 *Testijiet funzjonali*

L-istess bħall-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati, it-testijiet funzjonali għandhom ukoll ikunu mwettqa qabel l-espożizzjoni preċedenti u ta' spiss minn hemm il-quddiem fuq l-annimali kollha magħzula għal dan l-iskop (ara t-Tabella 1) Il-frekwenza tat-testijiet funzjonali hija wkoll dipendenti fuq it-tul ta' l-istudju (ara t-Tabella 2). B'żieda mal-perijodi ta' l-osservazzjoni kif elenkati fit-Tabella 2, l-osservazzjonijiet funzjonali fuq gruppi satellita ta' l-irkupru għandhom ukoll isiru malajr kemm jista' jkun possibbli lejn il-qtil tat-terminazzjoni. It-testijiet funzjonali għandhom jinkludu ir-reattività sensorja għall-istimu ta' diversi modalitajiet, eż. l-istimuli awditorji, vizwali u proprjozeptivi (5)(6)(7)), bl-assaġġ tal-forza tad-dirgħajn u s-saqajn (8) u l-assaġġ ta' l-attività motorili (9). L-attività motorili għandha tkun imkejla b'apparat awtomatiku li jkun kapaċi jiżvela kemm it-tnaqqis u wkoll iż-żidiet fl-attività. Jekk tkun użata sistema definita ohra, din għandha tkun kwantitattiva u s-sensittività u l-affidabbiltà tagħha għandhom ikunu dimostrati. Kull apparat għandu jkun ittestjat sabiex jassigura affidabbiltà matul iż-żmien u li jkun konsistenti bejn l-apparati. Aktar dettalji tal-proċeduri li jistgħu ikunu segwiti huma mogħtija fir-referenzi rispettivi. Jekk ma jkun hemm l-ebda informazzjoni (eż. attività strutturali, dettalji epidemjoloġiċi studju tossikoloġiċi ohrajn(sabiex jindikaw l-effetti newrotossiċi potenzali, l-inkluzjoni ta' aktar testijiet speċjalizzati tal-funzjoni sensorja u motorili jew tat-tgħallim u tal-memorja, sabiex jeżaminaw dawn l-effetti possibbli f'aktar dettall, għandhom ikunu ikkonsidrati. Aktar informazzjoni dwar testijiet speċjalizzati u l-użu tagħhom hija disponibbli fi (1).

B'mod eċċezzjonali, l-annimali li jiżvelaw sinjali ta' tossiċità sal-limitu li din tkun sinifikament tfixkel it-test funzjonali, dawn jistgħu jiġihallaw barra mit-test. Ġustifikazzjoni għall-eliminazzjoni ta' l-annimali minn test funzjonali għandha tkun ipprovduta.

1.6.2 **Il-piż tal-ġisem u l-konsum ta' l-ikel/ilma**

Għal studju ta' sa 90 jum, l-annimali kollha għandhom ikunu miżuna mill-anqas darba fil-ġimgħa u l-kejl għandu jittiehed tal-konsum ta' l-ikel (konsum ta' l-ilma, meta s-sustanza tat-test hija somministrata b'dik il-medja) mill-anqas darba fil-ġimgħa. Għal studji fit-tul, l-annimali kollha għandhom ikunu miżuna mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13-il ġimgħa u mill-anqas kull 4 ġimgħat minn hemm il-quddiem. Il-kejl għandu jsir fuq il-konsum ta' l-ikel (il-konsum ta' l-ilma, meta s-sustanza tat-test hija somministrata b'dik il-medja) mill-anqas darba fil-ġimgħa għall-ewwel 13 il-ġimgħa u imbagħad f'madwar intervalli ta' tlett-xhur, sakemm l-istat tas-saħħa jew tat-tibdiliet fil-piż tal-ġisem jiddettaw mod iehor.

▼B

1.6.3

Optalmoloġija

Għal studji itwal minn 28 jum, l-eżaminazzjoni optalmoloġika, bl-użu ta' optalmoskopju jew strument ekwivalenti addattat, għandha ssir qabel l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test u fit-terminazzjoni ta' l-istudju, preferibbilment fuq l-annimali kollha, imma mill-anqas fuq l-annimali f'doża għolja u l-gruppi ta' kontroll. Jekk tibdiliet fl-ghajnejn ikunu żvelati, jew, jekk sinjali kliniċi jindikaw il-htieġa, l-annimali kollha għandhom ikunu eżaminati. Għal studji fit-tul, eżaminazzjoni optalmoloġika għandha titwettaq mat-13-il ġimgħa. L-eżaminazzjonijiet optalmoloġiċi ma humiex meħtieġa jekk din l-informazzjoni tkun diġa disponibbli minn studji oħrajn ta' tul simili u flivelli ta' doża simili.

1.6.4

Hematoloġija u l-biokemistrija klinika

Meta l-istudju newrtossiku jkun imwettaq flimkien ma studju tossiku sistematiku b'doża repetuta, l-eżaminazzjonijiet hematoloġiċi u d-determinazzjoni tal-biokemistrija klinika għandhom jitwettqu kif elenkat fil-Metodu rispettiv ta' l-istudju tossiku sistematiku. Il-ġbir tal-kampjuni għandu jkun imwettaq b'tali mod li xi effetti potenzjali fuq in-newro-imġieba jkunu minimizzati.

1.6.5

Histopatoloġija

L-eżaminazzjoni newropatoloġika għandha tkun iddisinjata sabiex tikkomplementa u testendi l-opsservazzjonijiet magħmula matul il-fażi *in vivo* ta' l-istudju. Siltiet minn mill-anqas 5 annimali/sess/-grupp (ara t-Tabella 1 u l-paragrafu li ġej) għandhom jitwettqu *in situ*, bl-użu ta' perfużjoni ġenerali rikonossuta u t-teknika tal-fissazzjoni (ara r-referenza 3, il-kapitolu 5 u r-referenza 4, il-kapitolu 50). Kwalunkwe tibdiliet kbar osservabbli għandhom ikunu irreġistrati. Meta l-istudju jkun imwettaq bħala aspett ta' l-istudju wahdu dwar in-newrotossicità hew sabiex jikkarakterizza l-effetti newrotossici, il-kumplement ta' l-anniamli jistgħu ikunu użati jew għal newro-imġieba speċifika (10) (11), newropatoloġija (10) (11) (12) (13), mewrokimika (10) (11) (14) (15) jew elettropsikoloġija (10) (11) (16) (17), proċeduri li jistgħu jissupplementaw il-proċeduri u l-eżaminazzjonijiet deskritti hemmhekk, jew sabiex izidu in-numru ta' suġġetti eżaminati għall-histopatoloġija. Dawn il-proċeduri supplementari jistgħu ikunu partikolarment utili meta l-opsservazzjonijiet empiriċi jew l-effetti mistennija jindikaw tip jew mira speċifika tan-newrotossicità ta' kimika. B'mod alternattiv, il-kumplement ta' l-annimali jistgħu wkoll ikunu użati għal evalwazzjoni patoloġiċi ta' rutina kif deskritt fil-Metodu għal studju ta' doża repetuta.

Proċedura ta' tbghajja ġenerali, bħal ma hija l-hematossilin u l-eosin (H&E), għandha tkun imwettqa fuq il-kampjuni tal-biċċiet kollha mghaddsa fil-paraffin, u eżaminazzjoni mikroskopika għandha tkun imwettqa. Jekk ikunu osservati sinjali ta' newropatija periferali, jew jekk dawn ikunu issuspetati, kampjuni mghaddsa fil-plastika tan-nisġa tal-nervu periferali, għandha tkun eżaminata. Sinjali kliniċi jistgħu wkoll jissuġġerixxi siti addizzjonali għall-eżaminazzjoni jew l-użu ta' proċeduri speċjali tat-tbghajja. Gwida dwar siti addizzjonali tista' tinsab fi (3) (4). Tbghajja speċjali xierqa sabiex jurutipi speċifiċi tat-tibdil patoloġiku jistgħu wkoll ikunu ta' ghajnuna (18).

▼B

Sezzjonijiet rapreżentattivi tas-sistema nervuża ċentrali u periferali għandhom ikunu eżaminati b'mod ġistologiku (ara r-referenza 3, il-kapitolu 5 u r-referenza 4, il-kapitolu 50). Iż-żoni eżaminati għandhom normalment jinkludu: Il-parti ta' quddiem tal-moħħ, iċ-ċentru tal-cerebrum, inkluzi sezzjoni matul il-hippocampus, il-moħħ fin-nofs, il-cerebellum, il-pons, il-medulla oblongata, l-għajnejn bin-nerv ottiku u r-retina, l-ispina dorsali u t-tinfieħ ċervikali u lumbari, il-ganġilja ta' l-għerq dorsali, il-fibri dorsali u vetrari, in-nerv xjatiċ prossimali, innerv tibjali prossimali (fl-irkoppa) u n-nerv tibjali fil-friegħi tal-musolu tal-pexxun. L-ispina dorsali u s-sezzjonijiet tan-nervi periferali għandhom jinkludu s-sezzjonijiet laterali jew transversjali u longitudinali. Attenzjoni għandha tkun mogħtija għas-sistema vaskulaturali u nervuża. Kampjun tal-muskolu skeletali, partikolarment il-muskolu tal-pexxun, għandu wkoll ikun eżaminat. Attenzjoni speċjali għandha tingħata lis-siti bi struttura ċellulari u fibruża u d-disinn fil-CNS u il-PNS magħrufa li huma partikolarment affettwati bin-newrotossikanti,

Gwida dwar l-alterazzjonijiet newropatologikali li tipikament jirriżultaw minn espożizzjoni tossika jistgħu jinstabu fir-referenzi (3) (4). Ezma ta' pass b'pass tal-kampjuni tal-biċċiet huwa rakkommandat li fih is-sezzjonijiet minn grupp ta' doża għolja jkunu l-ewwel paragunati ma dawk tal-grupp ta' kontroll. Jekk l-ebda tibdiliet newropatologikali ma jkunu osservati fil-kampjuni minn dawn il-gruppi, analiżi sussegwenti ma tkunx meħtieġa. Jekk alterazzjonijiet newropatologiċi jkunu osservati fil-grupp ta' doża għolja, il-kampjun minn kull nisġiet potenzalment affettwati, mill-gruppi tad-doża medja jew baxxa, għandhom imbagħad ikunu kodifikati u sekwenzalment eżaminati.

Jekk xi evidenza ta' alterazzjonijiet newropatologikali tkun misjuba fl-eżaminazzjoni kwalitattiva, allura it-tieni eżaminazzjoni għandha tkun imwettqa fuq ir-regjuni kollha tas-sistema nervuża li turi dawn l-alterazzjonijiet. Sezzjonijiet mill-gruppi tad-doži kollha minn kull regjun potenzalment affettwat għandhom ikunu kodifikati u eżaminati kif jinzerta mingħajr ma tkun magħrufa l-kodiċi. Il-frekwenza u s-severità ta' kull ferita għandha tkun registrata. Wara li r-regjuni kollha mill-gruppi tad-doži kollha jkunu ġew iġġradati, il-kodiċi tista' tkun żvelata ul-analiżi statistika mwettqa sabiex tevalwa r-relazzjonijiet doża-reazzjoni. Eżempji tal-grad differenti tas-severità ta' kull ferita għandhom ikunu deskritti.

Is-sejbiet newrotoġologiċi għandhom ikunu evalwati fil-kuntest ta' l-osservazzjoni u l-kejl ta' l-imġieba, kif ukoll xi informazzjoni oħra mill-istudji preċedenti u konkurrenti tat-tossiċità sistematika dwar is-sustanza tat-test.

2. DATA

2.1 TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Data ta' l-animall individwali għandha tkun ipprovduta. B'zieda, l-informazzjoni kollha għandha tkun miġbura f'sommarju, f'għamla tubulati, li turi għal kull test jew għal kull grupp, in-numru ta' l-animalli fil-bisu tat-test, in-numru ta' l-animalli misjuba mejta waqt it-test jew dawk maqtula għal raġunijiet umanitarji, u l-hin tal-mewt jew tal-qtil umanitarju, in-numru li juru sinjali ta' tassiċità, deskrizzjoni tas-sinjali tat-tossiċità osservati, inkluz il-hin ta' meta jiskoppjaw, it-tul tal-hin, it-tip u s-severità ta' effetti tossiċi, in-numru ta' l-animalli li jkollhom feriti, inkluzi t-tipi u s-severità tal-feriti.

▼B

- 2.2 EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI
- Is-sejbiet ta' l-istudju għandhom ikunu evalwati f'termini ta' l-inċidenza, severità u korrelazzjoni ta' l-effetti newro-imġieba u newro-patoloġiċi (l-effetti bewrokimiċi jew elettrofizjoloġiċi kif ukoll jekk l-eżaminazzjonijiet supplementari huma nkluzi) u xi effetti ħżiena oħrajn li jkunu osservati. Meta possibbli, r-riżultati numeriċi għandhom ikunu evalwati bil-metodu xieraq u ġeneralment statistikament aċċettabbli. Il-metodi statistiċi għandhom ikunu magħżula matul id-disinn ta' l-istudju.

3. **RAPPORTAĠĠ**

3.1 **RAPPORT TAT-TEST**

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

Is-sustanza tat-test:

- in-natura fiżika (inkluzi l-propjetajiet iżomeriċi, l-purità u fiżi-kokimiċi);
- dettalji ta' l-identifikazzjoni.

Mezz (jekk applikabbli):

- il-ġustifikazzjoni tal-mezz użat.

Annimali tat-test:

- speċje/tipi użati;
- in-numru, l-età u s-sess ta' l-annimali;
- is-sorsi, il-kundizzjonijiet tal-gaġġeg, id-dieta, etc;
- il-piżijiet individwali ta' l-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

- dettalji dwar is-sustanza tat-test, fomulazzjoni/preparazzjoni tad-dieta, il-koncentrazzjoni akkwistata, l-istabbiltà u l-omoġenità tal-preparazzjoni;
- speċifikazzjonijiet tad-dożi amministrati, inkluzi d-dettalji tal-mezz, il-volum u l-ghamla fiżika tal-materjal amministrat;
- dettalji ta' l-amministrazzjoni tas-sustanza tat-test;
- ir-raġjonar għal-livell tad-doża magħżula;
- ir-raġġjonar tar-rotta u t-tul ta' żmien ta' l-espożizzjoni;
- skambju mis-sustanza tat-test minn dieta/ilma tax-xorb bil-koncentrazzjoni (ppm) lejn doża attwali (mg/kg il-piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Osservazzjoni u proċedura tat-test:

- dettalji ta' l-assenjar ta' l-annimali lejn kull grupp u tat-tixrid tas-sub-gruppi;
- dettalji tas-sistemi tal-marki, inkluża l-kriterja għall-iskali tal-marki dwar kull kejl fl-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati;

▼B

- dettalji dwar it-testijiet funzjonali għar-reattività sensorja lejn l-istimuli ta' modalitajiet differenti (eż. awditorji, viżwali u proprijocettivi); għall-assessjar tal-forza tal-qabda tad-driegħ jew tas-sieq; għall-assessjar ta' l-attività motorili (inklużi dettalji ta' apparat awtomatiku sabiex jiżvela l-attività); u l-proċeduri l-oħrajn kif użati;
- dettalji ta' l-eżaminazzjonijiet optalmoloġiċi u, jekk xieraq, l-eżaminazzjonijiet hematoloġiċi u t-testijiet kliniċi tal-biokemistrija bil-valuri relavanti tal-bidu;
- dettalji għall-proċeduri newroimġieba, newropatoloġija, newrokimika jew elettrofizjoloġiċi speċifiċi.

Riżultati:

- il-piż tal-gisem/tibdillet fil-piż tal-gisem, inklużi l-piż tal-gisem mal-qatla;
- il-konsum ta' l-ikel u l-konsum ta' l-ilma, kif xieraq;
- dettalji tar-reazzjoni tossika bis-sess u l-livell tad-doża, inklużi sinjali ta' tossiċità jew mortalità;
- in-natura, is-severità u t-tul ta' żmien (il-waqt ta' meta jiskoppja u l-korsa sussegwenti) ta' l-osservazzjonijiet kliniċi (sew jekk riversibbli u anki jekk le);
- deskrizzjoni dettaljata tar-riżultati kollha tat-test funzjonali;
- is-sejbiet tan-nekropsija;
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha, newroimġieba, newropatoloġikali, u newrokimiċi jew elettrofizjoloġiċi, jekk disponibbli;
- id-dettalji ta' l-assorbazzjoni u l-metabolizmu, (jekk disponibbli);
- trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq.

Diskussjoni tar-riżultati:

- informazzjoni dwar ir-reazzjoni mad-doża;
- relazzjoni ma xi effetti tossiċi oħrajn lejn konklużjoni dwar il-potenzal newrotossiku tal-kimika tat-test;
- il-livell ta' l-ebda effett hazin ma jkun osservat.

Konklużjonijiet:

- stqarrija speċifika dwar il-globalità newrotossika tal-kimika tat-test hija nkorraġġita.

4.**REFERENZI**

- (1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.
- (2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
- (3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- (4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/-London.

▼ B

- (5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- (6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
- (7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Inter-laboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.
- (10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
- (11) Chang, L.W., ed. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York.
- (12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689-695.
- (13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343-352.
- (14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10, 445-452.
- (15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368-378.
- (16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.
- (17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.
- (18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.



Tabella 1

Numru minimu ta' annimali mehtieġa għal kull grupp meta l-istudju newrotossiku ikun imwettaq separatament jew flimkien ma studji ohrajn

	STUDJU NEWROTOSSIKU IMWETTAQ BHALA:			
	Studju separate	Studju flimkien mal-istudju ta' 28 jum	Studju flimkien mal-istudju ta 90 jum	Studju flimkien mal-istudju dwar it-tossiċità kronika
Numru totali ta' l-annimali kull grupp	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	15 maskili u 15 femminili	25 maskili u 25 femminili
Numru ta' annimali magħżula għal testijiet funzjonali, inklużi l-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili	10 maskili u 10 femminili
Numru ta' annimali magħżula għal kull tixrid <i>in situ</i> u n-newrohistopatoloġija	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili	5 maskili u 5 femminili
Numru ta' annimali magħżula għall-osservazzjonijiet ta' dozi tossiċi ripetuti/subkroniċi/koron iċi, il-hematoloġija, il-biokemistrija klinika, il-histopatoloġija, eċċ., kif indikat fil-Linji ta' Gwida rispettivi.		5 maskili u 5 femminili	10 maskili u 10 femminili †	20 maskili † u 20 femminili †
Osservazzjoni supplementarja, kif xieraq	5 maskili u 5 femminili			

† tinkludi hames annimali magħżula għall-ittestjar funzjonali u osservazzjonijiet kliniċi bhala parti mill-istudju tan-newrotossiċità



Tabella 2

Frekwenza ta' l-osservazzjonijiet kliniċi u tat-testijiet funzjonali

Tip ta' l-osservazzjoni		It-tul ta' l-istudju			
		Akut	28-jum	90-jum	Kroniku
L-annimali kollha	Kondizzjoni ġenerali tas-saħħa	Kull jum	Kull jum	Kull jum	Kull jum
	Mortalità/morbidità	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum	Darbtejn kull jum
Fl-annimali magħżula għall-osservazzjonijiet funzjonali	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Fi żmien 8 siegħat mid-doża fl-estimat-hin l-aktar effettiv — Fil-jum 7 u 14 ta' wara d-doża	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fil-gimgha minn hemmil-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba matul l-ewwel u t-tieni gimgha ta' l-espożizzjoni — Darba fix-xahar minn hemmil-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fit-tmien ta' l-ewwel xahar ta' l-espożizzjoni — Darba kull tlett xhur, minn hemmil-quddiem
	Testijiet Funzjonali	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Fi żmien 8 siegħat mid-doża fl-estimat-hin l-aktar effettiv — Fil-jum 7 u 14 ta' wara d-doża	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Matul ir-raba' gimgha tat-trattament, kemm jista' jkun qrib possibbli lejn it-tmien tal-perjodu ta' l-espożizzjoni	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba matul l-ewwel u t-tieni gimgha ta' l-espożizzjoni — Darba fix-xahar minn hemmil-quddiem	— Qabel l-ewwel espożizzjoni — Darba fit-tmien ta' l-ewwel xahar ta' l-espożizzjoni — Darba kull tlett xhur, minn hemmil-quddiem

▼B

- B.44. **L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VIVO***
1. **IL-METODU**
- Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 427 (2004).

1.1 **DAHLA**

L-espożizzjoni għal hafna kimiċi ssir l-aktar permezz tal-ġilda filwaqt li l-parti l-kbira ta' l-istudji tossikoloġi mwettqa fuq l-annimali tal-laboratorju jużaw ir-rotta orali ta' l-amministrazzjoni. L-istudju ta' l-assorbiment perkutanju *in vivo* stabbilit f'din il-linja gwida jipprovdi l-kollegament mehtieġ biex jiġi estrapolat mill-istudji orali meta jsiru l-valutazzjonijiet tas-sigurtà wara l-espożizzjoni dermali.

Sustanza trid bilfors taqşam għadd kbir ta' saffi ta' ċelloli tal-ġilda qabel ma tilhaq iċ-ċirkolazzjoni. Il-pass li jiddetermina r-rata għall-parti l-kbira tas-sustanza huwa l-*istratum corneum* li jikkonsisti f'ċelloli mejtin. Il-permeabbiltà mill-ġilda tiddependi kemm fuq il-lopofiliċità tal-kimika kif ukoll fuq il-hxuna tas-saff barrani ta' l-epidermis, ukoll fuq fatturi bħall-piż molekulari u l-konċentrazzjoni tas-sustanza. B'mod ġenerali, il-ġilda tal-firien u tal-fniek hija aktar permeabbli minn dik tal-bnedmin, filwaqt li l-permeabilità tal-ġilda tal-fniek ta' l-indi u tax-xadini hija aktar simili għal dik ta' l-umani.

Il-metodi biex jitkejjel l-assorbiment perkutanju jistgħu jitqassmu f'żewġ kategoriji; *in vivo* u *in vitro*. Il-metodu *in vivo* huwa kapaċi li jipprovdi informazzjoni tajba, f'bosta speċi tal-laboratorju, dwar l-assorbiment mill-ġilda. Aktar reċenti, ġew żviluppati l-metodi *in vitro*. Dawn jużaw it-trasport minn ġilda ta' hxuna shiha jew parzjali ta' l-annimali jew umana lejn kontenitur ta' l-ilma. Il-metodu *in vitro* huwa deskritt f'Metodu tat-Test separat (1). Huwa rrakkomandat li d-Dokument ta' Gwida ta' l-OECD għat-Twettiq ta' l-Istudji dwar l-Assorbiment mill-Ġilda (2) jiġi kkon-sultat għall-ghajnuna fl-ghażla tal-metodu tal-aktar xieraq fis-sitwazzjoni, għaliex jipprovdi aktar dettalji dwar kemm huma xierqa l-metodi *in vivo* u *in vitro*.

Il-metodu *in vivo*, deskritt f'dan il-metodu, jippermetti d-determinazzjoni tal-penetrazzjoni tas-sustanza tat-test mill-ġilda għal ġewwa l-kompartiment sistemiku. It-teknika intużat b'mod mifruq għal hafna snin (3)(4)(5)(6)(7). Għalkemm l-istudji *in vitro* dwar l-assorbiment perkutanju jistgħu jkunu xierqa f'hafna każijiet, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn studju *in vivo* biss jista' jipprovdi d-data mehtieġa.

Il-vantaġġi tal-metodu *in vivo* huma li juża sistema li hija fiżjoloġikament u metabolikament intatta, juża speċi li hija komuni għal bosta studji dwar it-tossiċità u jista' jiġi mmodifikat għall-użu ma' speċi oħrajn. L-izvantaġġ huma li jintużaw annimali hajjin, il-bżonn ta' materjal li huwa radjotikkettjat biex jiġu ffaċilitati r-rizultati dipendibbli, u d-diffikultajiet fid-determinazzjoni tal-fażi ta' l-assorbiment bikri u d-differenzi fil-permeabilità tal-ġilda ta' l-ispeċi preferita (firien) u tal-bniedem. Il-ġilda ta' l-annimali normalment hija aktar permeabbli u għalhekk tista' tohloq stima kbira wisq dwar l-assorbiment perkutanju tal-bniedem (6)(8)(9). Is-sustanzi kawstiċi/korrożivi m'għandhomx jiġu ttestjati fl-annimali hajjin.

▼B

1.2 DEFINIZZJONIJIET

Doża mhux assorbita: tirrappreżenta dik maħsula mill-wieċ tal-ġilda wara l-espożizzjoni u kwalunkwe doża preżenti fuq il-kopertura mhux poruża, inkluża kwalunkwe doża murija li tiżvinta minn fuq il-ġilda matul l-espożizzjoni.

Doża assorbita (*in vivo*): tinkludi dik preżenti fl-urina, fil-ħasil tal-gaggi, fil-feċi, fl-arja skaduta (jekk tiġi mkejla), fid-demm, fiċ-ċellooli (jekk jingabru) u fil-karkass li jifdal, wara t-tneħħija tal-ġilda tas-sit ta' l-applikazzjoni.

Doża li tista' tiġi assorbita: tirrappreżenta d-doża preżenti fuq jew ġewwa l-ġilda wara l-ħasil.

1.3 IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test, preferibbilment radjotikkettjata, hija applikata fuq il-ġilda mqaxxa ta' annimali f'livell wieħed jew aktar ta' doża xierqa fil-forma ta' preparazzjoni fl-użu rappreżentattiva. Il-preparazzjoni tat-test hija permessa li tibqa' fil-kuntatt mal-ġilda għal perjodu ta' żmien fiss taht kopertura xierqa (mhux poruża, semi-poruża, jew poruża) biex tiġi mrażżna l-ingestjoni tal-preparazzjoni tat-test. Fl-aħħar tal-hin ta' l-espożizzjoni l-kopertura titneħħa u l-ġilda titnaddaf b'agent xieraq tat-tindif, il-kopertura u l-materjali tat-tindif jinżammu għall-analizi u tiġi provduta kopertura oħra. L-annimali jinżammu qabel, matul u wara l-perjodu ta' l-espożizzjoni f'gagġi tal-metaboliżmu individwali, u l-hmieġ u l-arja minfuha 'l barra f'dawn il-perjodi jingabru għall-analizi. Il-ġbir ta' l-arja minfuha 'l barra jista' jithalla barra meta hemm biżżejjed informazzjoni li ftiit jew xejn metabolit radjoattiv ma jiġi fformat. Normalment kull studju jinvolvi bosta gruppi ta' annimali li se jiġu esposti għall-preparazzjoni tat-test. Grupp wieħed jinqatel fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni. Gruppi oħrajn jinqatlu f'intervalli ta' hin skedati wara dan (2). Fl-aħħar tal-hin tat-tehid tal-kampjuni l-annimali li jifdal jinqatlu, jingabar id-demm għall-analizi, jitneħħa s-sit ta' l-applikazzjoni għall-analizi u l-karkass huwa analizzat għal materjal li ma ġiex ekskretat. Il-kampjuni huma mogħdija mill-esperiment b'mezzi xierqa u l-livell ta' l-assorbiment perkutanju jiġi stmat (6)(8)(9).

1.4 DESKRIZZJONI TAL-METODU

1.4.1 L-ġhażla ta' l-ispeċi ta' l-annimali

Il-far huwa l-ispeċi użata l-aktar spiss, iżda ferġhat u speċi mingħajr suf li għandhom rati ta' l-assorbiment tal-ġilda aktar simili għal dawg tal-bnedmin, jistgħu jintużaw ukoll (3)(6)(7)(8)(9). Għandhom jintużaw annimali adulti żgħażaġh u b'saħħithom ta' sess uniku (is-sess normali huwa maskili) ta' ferġhat użati hafna fil-laboratorji. Fil-bidu ta' l-istudju, il-varjazzjoni tal-piż ta' l-annimali użati m'għandhiex teċċedi $\pm 20\%$ tal-piż medju. Bħala eżempju, il-firien maskili ta' 200 g – 250 g huma xierqa, b'mod partikolari fl-ogħla nofs ta' din il-firxa.

▼B**1.4.2 L-ghadd u s-sess ta' l-annimali**

Ghandu jintuza ghal kull preparazzjoni tat-test u ghal kull hin ta' tmiem skedat, grupp ta' mhux inqas minn erba' annimali ta' sess uniku. Kull grupp ta' annimali jinqatel wara intervalli ta' zmien differenti, per eżempju fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni (tipikament 6 sigħat jew 24 siegħa) u fuq okkorrenzi sussegwenti (eż. 48 u 72 siegħa). Jekk hemm data disponibbli li juru differenzi sustanzjali fit-tossiċità dermali bejn il-maskili u l-femminili, ghandu jintgħażel is-sess l-aktar sensitiv. Jekk ma hemmx data minn din, jista' jintuza kwalunkwe sess.

1.4.3 Il-kundizzjonijiet taż-żamma u l-ghalf

It-temperatura fil-kamra ta' l-esperimenti ta' l-annimali ghandha tkun ta' 22 °C ($\pm$ 3 °C). Għalkemm l-umdità relattiva ghandha tkun għall-inqas 30 % u preferibbilment ma teċċedix 70 % hlief matul it-tindif tal-kamra, wiehed ghandu jimmira lejn 50-60 %. Id-dawl ghandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-ghalf, jistghu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju u għandhom ikunu liberament disponibbli flimken ma' provvista minghajr limitu ta' ilma għax-xorb. Matul l-istudju, u preferibbilment ukoll matul l-akklimatizzazzjoni, l-annimali jinżammu individwalment f'gāgēg tal-metaboliżmu. Ladarba t-twaqqigh ta' l-ikel u ta' l-ilma jista' jikkomprometti r-riżultati, il-probabbiltà ta' dawn l-okkorrenzi ghandha tiġi minimizzata.

1.4.4 Il-preparazzjoni ta' l-annimali

L-annimali huma mmarkati biex tkun possibbli l-identifikazzjoni individwali u jinżammu fil-gāgēg tagħhom għall-inqas għal hamest ijjiet qabel ma jinbeda l-istudju biex tkun possibbli l-akklimatizzazzjoni għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju.

Wara l-perjodu ta' l-akklimatizzazzjoni, u madwar 24 siegħa qabel ma tingħata d-doża, kull animal ikollu parti ta' ġilda fir-regjun ta' l-ispallejn u d-dar imqaxxa. Il-karatteristiċi ta' permeazzjoni ta' ġilda danneġġjata huma differenti mill-ġilda intatta u ghandu jkun hemm attenzjoni li l-ġilda ma tinbaraxx. Wara t-tqaxxir u madwar 24 siegħa qabel ma tiġi applikata s-sustanza tat-test, (ara t-tqsima 1.4.7) il-wieċ tal-ġilda ghandu jintmesaħ bl-aċeton biex jitneħħa s-sebum. Mhijiex rakkomandata ħasla addizzjonali bis-sapun u bl-ilma għaliex ir-residwu tas-sapun jista' jippromwovi l-assorbiment tas-sustanza tat-test. Iz-zona ghandha tkun kbira biżżejjed biex tippermetti kalkolu dipendibbli ta' l-ammont tal-kimika tat-test assorbit, preferibbilment għall-inqas 10 cm². Din iz-zona hija Prattikabbli bil-firien ta' piż tal-ġisem ta' 200-250 g. Wara l-preparazzjoni, l-annimali jiġu ritornati għal-gāgēg tal-metaboliżmu.

1.4.5 Is-sustanza tat-test

Is-sustanza tat-test hija l-entità li l-karatteristiċi tal-permeazzjoni tagħha għandhom jiġu studjati. Idealment, is-sustanza tat-test ghandha tiġi radjotikkettjata.

1.4.6 Il-preparazzjoni tat-test

Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test (eż. materjal mhux imhallat, imhallat jew ifformulat li fih il-kimika tat-test li hija applikata għall-ġilda) ghandha tkun l-istess (jew surrogat realistiku) bħal dik li għalihom jistghu jkunu esposti l-umani jew speċi oħrajn potenzjali mmirati. Kwalunkwe varjazzjoni mill-preparazzjoni "fl-użu" ghandha tkun iġġustifikata. Fejn meħtieġ, is-sustanza tat-test hija mahlula jew sospiza f'kontenitur xieraq. Għal kontenituri minbarra l-ilma, il-karatteristiċi ta' l-assorbiment u l-interazzjoni potenzjali mas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa.

▼B

1.4.7

L-applikazzjoni tal-ġilda

Sit ta' applikazzjoni ta' arja tal-wiċċ speċifika hija ddefinita fuq wiċċ il-ġilda. Ammont maghruf tal-preparazzjoni tat-test huwa mbagħad applikat b'mod uniformi fuq is-sit. Dan l-ammont għandu normalment jimita l-espożizzjoni potenzjali umana, tipikament 1-5 mg/cm² għal solidu jew sa 10 µl/cm² għal-likwidi. Kwantitajiet oħrajn għandhom ikunu ġġustifikati bil-kundizzjonijiet ta' l-użu mistenni, l-ghanijiet ta' l-istudju jew il-karatteristiċi fiżiċi tal-preparazzjoni tat-test. Wara l-applikazzjoni, is-sit ittrattat għandu jiġi protett milli jintmess. Eżempju ta' tagħmir tipiku jintwera fil-Figura 1. Normalment, is-sit ta' l-applikazzjoni jiġi protett b'kopertura mhux poruża (eż. għata tal-garża tan-nylon permeabbli). Izda, għal applikazzjonijiet infiniti, is-sit ta' l-applikazzjoni għandu jiġi okkluż. Fil-każ li l-evaporazzjoni ta' sustanzi tat-test semi-volatili jnaqqas ir-rata ta' l-irkupru tas-sustanza tat-test sa livell mhux aċċettabbli (ara wkoll it-taqsim 1.4.1.0, l-ewwel paragrafu), huwa neċessarju li s-sustanza li żvintat tiġi evaporata f'filtru tal-faħam li jkopri t-tagħmir ta' l-applikazzjoni (ara l-Figura 1). Huwa importanti li t-tagħmir ma jagħmilx ħsara lill-ġilda, u lanqas ma jassorbi jew jirreaġixxi mal-preparazzjoni tat-test. L-annimali huma ritornati fil-gaġeġ tal-metabolizmu individwali sabiex jingabar il-ħmieġ tagħhom.

1.4.8

Kemm iddum l-espożizzjoni u t-tehid tal-kampjuni

Id-dewmien ta' l-espożizzjoni huwa l-intervall bejn l-applikazzjoni u t-tnehhija ta' preparazzjoni bil-ħasil tal-ġilda. Għandu jintuża perjodu rilevanti ta' l-espożizzjoni (tipikament 6 sigħat jew 24 siegħa) fuq bażi tad-dewmien ta' l-espożizzjoni mistennija umana. Wara l-perjodu ta' l-espożizzjoni, l-annimali jinżammu fil-gaġeġ tal-metabolizmu sat-terminazzjoni kif ippjanat. L-annimali għandhom jiġu osservati għal sinjali ta' tossiċità/reażjonijiet mhux normali f'intervalli regolari għal kemm idum l-istudju kollu. Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni, il-ġilda ttrattata għandha tiġi osservata għal sinjali viżibbli ta' irritazzjoni.

Il-gaġeġ tal-metabolizmu għandhom jippermettu l-ġbir separat ta' l-urina u l-feċi matul l-istudju kollu. Għandhom jippermettu l-ġbir ta' diossidu tal-karbonju ¹⁴C u komposti volatili ta' karbonju ¹⁴C, li għandhom jiġu analizzati meta prodotti f'kwantitajiet kbar (> 5 %). L-urina, il-feċi u l-fluwidi intrappolati (eż. diossidu tal-karbonju ¹⁴C u komposti volatili ta' ¹⁴C) għandhom jingabru individwalment minn kull gripp fil-ħin tat-tehid tal-kampjuni. Jekk hemm biżżejjed informazzjoni li ttit metabolit radojattiv li jiżvinta, jew xejn, ma jiġi ffurmat, jistgħu jintużaw gaġeġ miftuħin.

Matul il-perjodu ta' l-espożizzjoni, jingabru l-excreta, sa 24 siegħa wara l-ewwel kuntatt tal-ġilda u mbagħad kuljum sa l-aħħar ta' l-esperiment. Filwaqt li normalment ikunu biżżejjed tliet intervalli tal-ġbir ta' l-excreta, l-ghan ippjanat tal-preparazzjoni tat-test jew id-data kinetika eżistenti jistgħu jissuġġerixxu punti ta' żmien addizzjonali għall-istudju.

Fl-aħħar tal-perjodu ta' l-espożizzjoni it-tagħmir protettiv jitneħħa minn kull annimal u jitneħħa minn kull annimal u jinżamm separat għall-analizi. Jekk il-ġilda ttrattata ta' l-annimali kollha għandha tinħasel għall-inqas 3 darbiet bl-aġent tat-tindif bl-użu ta' tajjar xieraq. Għandu jkun hemm attenzjoni biex jiġi evitat il-kontaminazzjoni ta' partijiet oħrajn tal-ġisem. L-aġent tat-tindif għandu jirrappreżenta l-prattika normali ta' l-iġjene, eż. tahlita tas-sapun bl-ilma. Fl-aħħar, il-ġilda għandha tiġi xxuttata. It-tajjar kollu u l-ħasil kollu għandhom jinżammu għall-analizi. Għandha tiġi providuta kopertura friska biex is-sit ittrattat ta' daww l-annimali li jiffurmaw il-gruppi tal-punti ta' ħin ta' wara jiġi protett, qabel ma jittiehdu lura fil-gaġeġ individwali.

▼B

1.4.9

Il-proċeduri terminali

Għal kull grupp, l-annimali individwali għandhom jinqatlu fil-hin ippjanat u d-demm jingabar għall-analizi. It-tagħmir jew kopertura protettivi għandhom jitnehhew għall-analizi. Il-ġilda mis-sit ta' l-applikazzjoni u minn zona simili ta' ġilda mhux iddożata u mqaxxa għandhom jitnehhew minn kull annimali għal analizi separata. Is-sit ta' l-applikazzjoni jista' jkun frazzjonat biex jiġi sseparat l-*istratum corneum* mill-epidermis ta' taht biex tinghata aktar informazzjoni dwar id-dispożizzjoni tal-kimika tat-test. Id-determinazzjoni ta' din id-dispożizzjoni wara l-mogħdija ta' żmien ta' l-espożizzjoni għandha tippovdi xi indikazzjoni tad-destin ta' kwalunkwe kimika tat-test fl-*istratum corneum*. Biex tkun faċli l-frazzjonazzjoni tal-ġilda (wara l-aħħar hasla tal-ġilda u l-qtil ta' l-annimal) kull kopertura protettiva titneħħa. Il-ġilda tas-sit ta' l-applikazzjoni, biċ-ċirku anulari tal-ġilda madwarha, tinqata' minn mal-far u tiġi mwahħla b'labra fuq biċċa njama. Strixxa ta' tejp tiġi mwahħla mal-wiċċ tal-ġilda bl-użu ta' pressjoni bil-mod u t-tejp jitneħħa flimkien ma' parti mill-*istratum corneum*. Jiġu applikati strixxi ta' tejp oħrajn sakemm it-tejp ma jibqax jehel mal-wiċċ tal-ġilda, meta l-*istratum corneum* kollu jkun tneħħa. Għal kull animal, l-istrixxi kollha tat-tejp jistgħu jiġu kkombinati f'kontenitur wiehed li mbagħad jiżdied miegħu digestant tat-tessut biex jissolubilizza l-*istratum corneum*. Jistgħu jitnehhew tessuti potenzjalment immirati għal kejl separat qabel ma jiġi analizzat il-karkass residwali għad-doża assorbita tal-karkass. Il-karkassi ta' l-annimali individwali għandhom jinżammu għall-analizi. Normalment l-organi mmirati jitnehhew għall-analizi separata (jekk indikat minn studji oħrajn). L-urina preżenti fil-marrara fil-qtil ippjanat għandha tiżdied mal-ġabra ta' l-urina ta' qabel. Wara li jingabar il-hmieġ mil-ġaġeġ tal-metabolizmu wara l-qtil fil-hin ippjanat, il-ġaġeġ u l-bibien tagħhom għandhom jinhaslu b'solvent xieraq. Għandu wkoll jiġi analizzat tagħmir ieħor potenzjalment ikkontaminat.

1.4.10

Analizi

Fl-istudji kollha għandu jinkiseb l-irkupru xieraq (jiġifieri medja ta' $100 \pm 10\%$ tar-radjoattività). L-irkupru barra minn din il-firxa għandu jiġi ġġustifikat. L-ammont tad-doża somministrata f'kull kampjun għandu jiġi analizzat fi proċeduri validati kif xieraq.

Il-kunsiderazzjonijiet statistiċi għandhom jinkludu mizura ta' varjanza għar-replikati għal kull applikazzjoni.

2.

DATA

Dan il-kejl għandu jsir għal kull annimal, f'kull hin tat-tehid tal-kampjuni għall-kimika tat-test u/jew metabolite. Minbarra d-data individwali, id-data miġbura skond il-hinijiet tat-tehid tal-kampjuni għandha tiġi rrapportata bħala medja.

— kwantità assoċjata ma' l-applikazzjonijiet protettivi;

— kwantità li tista' tinqala' minn mal-ġilda;

— kwantità fi/fuq il-ġilda li ma tista'x tinhasel minn mal-ġilda;

▼B

- kwantità fid-demmi li ttehed bhala kampjun;
- kwantità fl-excreta u fl-arja skaduta (jekk xieraq);
- kwantità li jifdal fil-karkass u kwalunkwe organi mnehhi għall-analizi separata.

Il-kwantità tas-sustanza tat-test u/jew metabolit fil-hmieġ, fl-arja skaduta, fid-demmi u fil-karkass tippermetti d-determinazzjoni ta' l-ammont totali assorbit f'kull punt ta' hin. Jista' jinkiseb ukoll kalkolu ta' l-ammont ta' kimika tat-test assorbit għal kull cm^2 ta' gilda esposta għas-sustanza tat-test fil-perjodu ta' l-espożizzjoni.

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1 **IR-RAPPORT TAT-TEST**

Ir-rapport għandu jinkludi r-rekwiziti stipulati fil-protokoll, inkluża ġustifikazzjoni tas-sistema tat-test użata u għandu tinkludi dawn li ġejjin:

Is-Sustanza tat-Test:

- id-data ta' l-identifikazzjoni [eż. CAS numru, jekk disponibbli; għajn; safa (safa radjokimika); impuritajiet magħrufin; numru tal-lott]
- in-natura fizika, il-karatteristiċi fizikokimiċi (eż. pH, volatilità, solubilità, stabbiltà, piż molekulari u P_{ow}).

Il-preparazzjoni tat-test:

- formulazzjoni u ġustifikazzjoni ta' l-użu;
- dettalji tal-preparazzjoni tat-test, l-ammont applikat, il-konċentrazzjoni miksuba, il-mezz, l-istabbiltà u l-omoġeneità.

L-animall tat-test:

- speċi/fergħa użata;
- numbru, età u sess ta' l-animalli;
- għajn ta' l-animalli, kundizzjonijiet taż-żamma, dieti, eċċ.;
- piżijiet individwali ta' l-animalli fil-bidu tat-test.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

- dettalji ta' l-amministrazzjoni tal-preparazzjoni tat-test (sit ta' l-applikazzjoni, metodi ta' l-esperiment, porożità/nuqqas ta' porożità, volum, estrazzjoni, skoperta);
- dettalji tal-kwalità ta' l-ikel u l-ilma.

Riżultati:

- sinjali ta' tossiċità;
- data tabulata dwa l-assorbiment (espresso bhala rata, ammont jew persentaġġ);

▼B

- irkupri totali ta' l-esperiment;
- interpretazzjoni tar-riżultati, tqabbil ma' data disponibbli jew assorbiment perkutanju tal-kompost tat-test.

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

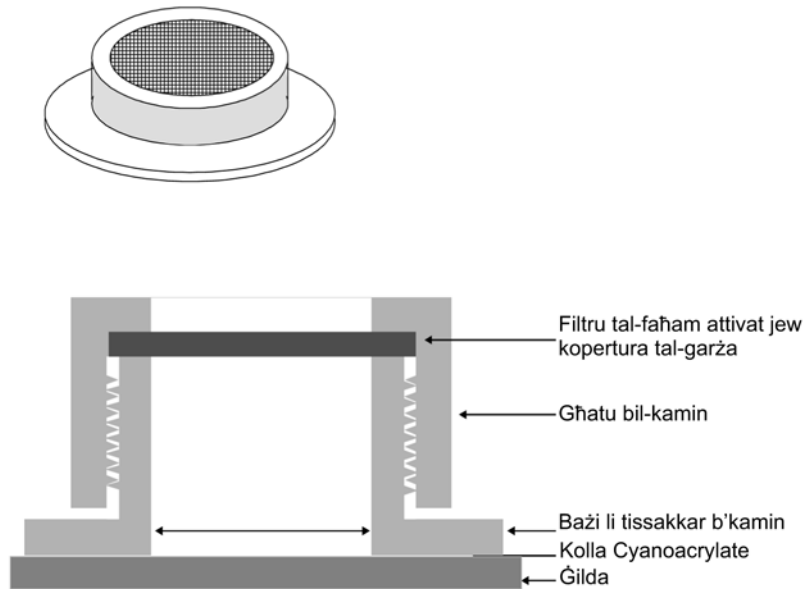
4.

REFERENZI

1. Metodu tat-Test B.45. L-Assorbiment tal-Ġilda: Metodu *In vitro*
2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.
4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829-835.
5. Kemppainen BW, Reifernath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.
9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼ B*Figura 1*

Eżempju ta' Dizinn ta' Tagħmir Tipiku użat biex jiġi Definit u Protett Sit ta' l-
Applikazzjoni Dermal matul Studji *in vivo* ta' l-Assorbiment Perkutanju



▼B

B.45. L-ASSORBIMENT TAL-ĠILDA: IL-METODU *IN VITRO*

1. IL-METODU

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalent għall-OECD TG 428 (2004).

1.1 DAHLA

Dan il-Metodu gie ddizinjat biex jipprovdi informazzjoni dwar l-assorbiment ta' sustanza tat-test applikata għall-ġilda maqtugħa barra. Jista' jiġi kkombinat mal-Metodu għall-Assorbiment tal-Ġilda: Il-Metodu *In vivo* (1), jew isir separatament. Huwa rrakkomandat li d-Dokument ta' Gwida ta' l-OECD għat-Twettiq ta' l-Istudji dwar l-Assorbiment mill-Ġilda (2) jiġi kkonsultat għall-ghajjnuna fid-disinn ta' l-istudji bbażati fuq dan il-Metodu. Id-Dokument ta' Gwida gie ppreparat biex jiffaċilita l-ghazla ta' proċeduri *in vitro* xierqa għall-użu f'ċirkostanzi speċifiċi, biex tiġi żgurata d-dependibbiltà tar-riżultati miksuba b'dan il-metodu.

Il-metodi biex jitkejjel l-assorbiment perkutanju jistgħu jitqassmu f'żewġ kategoriji: *in vivo* u *in vitro*. Il-metodi *in vivo* dwar l-assorbiment tal-ġilda huma stabbiliti sew u jipprovdu informazzjoni farmakokinetika f'firxa ta' speċje ta' l-annimali. Il-metodu *in vivo* huwa deskritt separatament f'Metodu tat-Test iehor (1). Il-metodi *in vitro* ukoll intużaw għal bosta snin biex jitkejjel l-assorbiment tal-ġilda. Għalkemm l-istudji tal-validazzjoni formali tal-metodi *in vitro* koperti b'dan il-Metodu tat-Test ma sarux, l-esperti ta' l-OECD qablu fl-1999 li kien hemm biżżejjed data evalwata biex issostni l-metodu *in vitro* (3). Aktar dettalji li jissostanzjaw dan is-sostenn, inkluż għadd sinjifikanti ta' paraguni diretti tal-metodi *in vitro* u *in vivo*, jingħataw mad-Dokument ta' Gwida (2). Hemm għadd ta' monografi li jeżaminaw dan is-suġġett u jagħtu sfond dettaljat dwar l-użu ta' metodu *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Il-metodi *in vitro* jkejlu d-diffużjoni tal-kimika fi u minn go l-ġilda lejn kontenitur tal-fluwidu u jistgħu jużaw ġilda mhux vijabbli biex ikejlu d-diffużjoni biss, jew ġilda attiva, metabolikament attiva, biex fl-istess hin ikejlu d-diffużjoni u l-metabolizmu tal-ġilda. Dawn il-metodi nstabu partikolarment utli bħala skrin għat-tqabbil tat-twassil tal-kimika fi u minn go l-ġilda minn formolazzjonijiet differenti u jistgħu wkoll jipprovdu mudelli utli għall-istima ta' l-assorbiment perkutanju mill-ġilda.

Il-metodu *in vitro* jista' ma jghoddx għas-sitazzjonijiet kollha jew għall-klassijiet kollha tal-kimiċi. Jista' jkun possibbli li jintuża l-metodu tat-test *in vitro* għall-evalwazzjoni kwalitattiva inizzjali tal-penetrazzjoni tal-ġilda. F'xi każijiet jista' jkun mehtieg li mbagħad ikun hemm id-data *in vivo*. Id-dokument ta' gwida (2) għandu jiġi kkonsultat għal aktar elaborazzjoni ta' sitwazzjonijiet fejn ikun xieraq il-metodu *in vitro*. Informazzjoni addizzjonali dettaljata biex tiġi sostnuta d-deċiżjoni tingħata f'(3).

Dan il-metodu jippreżenta l-prinċipji ġenerali biex jitkejjel l-assorbiment dermal u t-twassil tas-sustanza tat-test bl-użu tal-ġilda maqtugħa barra. Tista' tintuża l-ġilda minn bosta speċje mammi-feri, inklużi l-bnedmin. Il-karatteristiċi tal-permeabilità tal-ġilda jinżammu wara li tinqata' minn mal-ġilda għaljiex l-ostakolu prinċipali tad-diffużjoni huwa l-*istratum corneum* mhux vijabbli; it-trasport attiv tal-kimika mill-ġilda ma giex identifikat. Il-ġilda ntweriet li għandha l-kapaċità li timmetabolizza xi kimika matul l-assorbiment perkutanju (6), iżda dan il-proċess ma jillimitax ir-rata f'termini ta' doża attwalment assorbita, għalkemm jista' jaffettwa n-natura ta' materjal li dahlet fis-sistema tad-demmi.

▼ B

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Doża mhux assorbita: tirrappreżenta dik maħsula mill-wieċ tal-ġilda wara l-espożizzjoni u kwalunkwe doża preżenti fuq il-kopertura mhux poruza, inkluża kwalunkwe doża murija li tiżvinta minn fuq il-ġilda matul l-espożizzjoni.

Doża assorbita (*in vitro*): massa tas-sustanza tat-test li tilhaq il-fluwidu reċettur jew iċ-ċirkolazzjoni sistemika f'hin speċifikat.

Doża li tista' tiġi assorbita (*in vitro*): tirrappreżenta d-doża preżenti fuq jew ġewwa l-ġilda wara l-ħasil.

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Is-sustanza tat-test, li tista' tkun radjotikkettjata, hija applikata fuq il-wieċ ta' kampjun tal-ġilda li jissepara żewġ kompartimenti ta' ċellola tad-diffużjoni. Il-kimika tibqa' fuq il-ġilda għal żmien speċifikat taht kundizzjonijiet speċifikati, qabel ma titneħħa bi proċedura xierqa tat-tindif. Jittiehed kampjun tal-fluwidu reċettorju f'punti matul l-esperiment u jiġi analizzat għall-kimika tat-test u/jew metaboliti.

Meta jintużaw sistemi metabolikament attivi, il-metaboliti tal-kimika tat-test jistgħu jiġu analizzati b'metodi xierqa. Fl-aħħar ta' l-esperiment, id-distribuzzjoni tal-kimika tat-test u l-metaboliti tagħha jiġu kkwantifikati, meta jkun xieraq.

Bl-użu ta' kundizzjonijiet xierqa, li huma deskritti f'dan il-metodu u fid-dokument ta' gwida (2), l-assorbiment ta' sustanza tat-test matul terminu definit jitkejjel bl-analizi tal-fluwidu reċettorju u tal-ġilda trattata. Is-sustanza tat-test li jifdal fil-ġilda għandha titqies bħala assorbita mill-valuri tal-fluwidu reċettorji waħdu. L-analizi tal-komponenti oħrajn (materjal maħsul minn mal-ġilda u li jifdal fis-saffi tal-ġilda) tippermetti evalwazzjoni ulterjuri tad-data, inkluża d-dispożizzjoni totali tas-sustanza tat-test u l-perċentwal ta' l-irkupru.

Biex jintwera l-operat u d-dipendibbiltà tas-sistema tat-test fil-laboratorju tal-ħidma, ir-riżultati għall-kimiċi rilevanti ta' referenza għandhom ikunu disponibbli u bi qbil mal-letteratura pubblikata għall-metodu użat. Dan ir-rekwizit jista' jintlaħaq billi tiġi ttestjata sustanza xierqa ta' referenza (preferibbilment ta' lipofiliċità qrib is-sustanza tat-test) b'mod konkurrenti mas-sustanza tat-test jew bil-proviżjon ta' data storika xierqa għal għadd ta' sustanzi ta' referenza ta' lipofiliċità differenti (eż. il-kaffeina, l-aċidu benzoiku, u t-testosterone).

1.4. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.4.1 Iċ-ċellola tad-diffużjoni

Ċellola tad-diffużjoni tikkonsisti f'kompartiment donatur u kompartiment reċettorju li bejniethom titqiegħed il-ġilda (eżempju ta' dizinn tipiku huwa provdut fil-Figura 1). Iċ-ċellola għandha tipprovdi sigill tajjeb madwar il-ġilda, tippermetti t-teħid faċli tal-kampjuni u tahlit tajjeb tat-tahlita reċettorja f'kontatt mal-parti ta' taht tal-ġilda, u l-kontroll tajjeb tat-temperatura taċ-ċellola u l-kontenut tagħha. Iċ-ċelloli statiči u li jippermettu d-diffużjoni bit-tnixxija huma t-tnejn aċċettabbli. Normalment, il-kompartimenti donaturi jithallew mhux porużi matul l-espożizzjoni għal doża tal-preparazzjoni tat-test. Madankollu, għal applikazzjonijiet infiniti u għal xi xenarji għal doži finite, il-kompartimenti donaturi jistgħu jkunu porużi.

▼B**1.4.2. Il-fluwidu reċettorju**

L-użu ta' fluwidu reċettorju fiżjoloġikament konduċiv huwa preferit għalkemm jistgħu jintużaw kemm-il darba huma għgustifikati. Il-kompożizzjoni preċiża tal-fluwidu reċettorju għandha tkun provduta. Is-solubilità xierqa tal-kimika tat-test fil-fluwidu reċettorju għandha tintwera sabiex ma taġixxi bħala ostakolu għall-assorbiment. Barra minn hekk, il-fluwidu reċettorju m'għandux jaffettwa l-integrità tal-preparazzjoni tal-ġilda. F'sistema tat-tnixxija, ir-rata tat-tnixxija m'għandhiex tostakola d-diffużjoni ta' sostanza tat-test fil-fluwidu reċettorju. F'sistema ta' ċelloli statiči, il-fluwidu għandu jiġi mhawwad kontinwament u jittiehdu l-kampjuni regolament. Jekk il-metabolizmu qed jiġi studjat, il-fluwidu reċettorju għandu jsostni l-vijabilità tal-ġilda tul l-esperiment kollu.

1.4.3 Il-preparazzjonijiet tal-ġilda

Tista' tintuża ġilda minn għejun umani jew ta' l-annimali. Huwa rikonoxxut li l-użu tal-ġilda umana huwa soġġett għal kunsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali. Għalkemm hija preferuta ġilda vijabbli, tista' tintuża wkoll ġilda mhux vijabbli kemm-il darba l-integrità tal-ġilda tista' tintwera. Huma aċċettabbli membrani epidermali (separati enzimikament, bishana jew kimikament) jew ġilda ta' hxuna maqsuma (tipikament hoxna daqs 200-400 µm) ippreparati b'dermatome. Tista' tintuża ġilda ta' hxuna shiha iżda l-hxuna eċċessiva (ca. > 1 mm) għandha tiġi evitata kemm-il darba mhijiex speċifikament meħtieġa għad-determinazzjoni tal-kimika tat-test fis-saffi tal-ġilda. L-għażla ta' l-ispeċje, tas-sit anatomiku u tat-teknika preparattiva għandhom ikunu għgustifikati. Id-data aċċettabbli minn minimu ta' erba' replikati għal kull preparazzjoni tat-test hija meħtieġa.

1.4.4 L-integrità tal-Preparazzjoni tal-Ġilda

Huwa essenzjali li l-ġilda hija ppreparata sew. L-immanigġjar mhux xieraq jista' jirriżulta f'dannu lill-*istratum corneum*, u għalhekk l-integrità tal-ġilda ppreparata għandha tiġi ċċekkjata. Meta jiġi investigat il-metabolizmu tal-ġilda, il-ġilda maqtugħa barra friska għandha tintuża mill-aktar fis possibbli, u taht kundizzjonijiet magħrufa li jsostnu l-attività metabolika. Bħala gwida ġenerali, il-ġilda maqtugħa barra friska għandha tintuża fi żmien 24 siegħa, iżda l-perjodu aċċettabbli tal-ħażna jista' jvarja skond is-sistema ta' l-enzimi involuti fil-metabolizzazzjoni u t-temperaturi tal-ħażna (13). Meta l-preparazzjonijiet tal-ġilda jkunu nħażnu qabel ma jintużaw, għandha tingħata prova biex turi li l-funzjoni ta' ostakolu nżammet.

1.4.5 Is-sustanza tat-test

Is-sustanza tat-test hija l-entità li l-karatteristiċi tal-permeazzjoni tagħha għandhom jiġu studjati. Idealment, is-sustanza tat-test għandha tiġi radjotikkettjata.

1.4.6 Il-preparazzjoni tat-test

Il-preparazzjoni tas-sustanza tat-test (eż. materjal mhux imhallat, imhallat jew ifformulat li fih il-kimika tat-test li hija applikata għall-ġilda għandha tkun l-istess (jew surrogat realistiku) bħal dik li għalihom jistgħu jkunu esposti l-umani jew speċje oħrajn potenzjali mmirati. Kwalunkwe varjazzjoni mill-preparazzjoni "fluwu" għandha tkun iġġustifikata.

▼B**1.4.7 Il-Konċentrazzjonijiet u l-Formulazzjonijiet tas-Sustanzi tat-Test**

Normalment tintuża aktar minn konċentrazzjoni wahda li hija mifruxa fuq l-oghla espożizzjonijiet potenzjali umani. Bl-istess mod, għandu jitqies l-ittestjar ta' firxa ta' formulazzjonijiet tipiċi.

1.4.8 L-applikazzjoni tal-ġilda

Taht kundizzjonijiet normali ta' espożizzjoni umana għall-kimika, normalment ikun hemm dozi finiti. Għalhekk, għandha titntuża applikazzjoni li timita l-espożizzjoni umana, normalment 1-5 mg/cm² ġilda għal solidu u sa 10 µl/cm² għal-likwidi. Il-kwantità għandha tkun ġustifikata mill-kundizzjonijiet ta' l-użu mistenni, mill-ghanijiet ta' l-istudju jew mill-karatteristiċi tal-preparazzjoni tat-test. Per eżempju, l-applikazzjonijiet għall-wieċ tal-ġilda jistghu jkunu infiniti, fejn huma applikati volumi kbar għal kull zona ta' unità.

1.4.9 Temperatura

Id-diffużjoni passiva tal-kimiċi (u għalhekk l-assorbiment tagħhom mill-ġilda) hija affettwata mit-temperatura. Il-kompartiment tad-diffużjoni u l-ġilda għandhom jinżammu f'temperatura kostanti qrib dik normali tal-ġilda ta' 32±1 °C. Diżinji differenti taċċelloli jehtieġu temperaturi differenti tal-banju ta' l-ilma jew tal-blokka msahhna sabiex jiġi żgurat li r-reċettur/ġilda ikun/tkun fin-norma fiżjoloġika. L-umdità għandha preferibbilment tkun bejn it-30 u s-70 %.

1.4.10 Kemm idum l-espożizzjoni u t-tehid tal-kampjuni

L-espożizzjoni tal-ġilda għall-preparazzjoni tat-test tista' tkun għal kemm idum l-esperiment jew għal termini iqsar (jiġifieri, biex tiġi imitata espożizzjoni umana ta' tip speċifiku). Il-ġilda għandha tinhasel mill-preparazzjoni tat-test żejda b'agent tat-tindif rilevanti, u t-tlahliħ jingabar għall-analiżi. Il-proċedura tat-tnehhija tal-preparazzjoni tat-test tiddependi fuq il-kundizzjoni ta' l-użu mistenni, u għandha tiġi ġustifikata. Normalment huwa mehtieġ perjodu tat-tehid tal-kampjuni ta' 24 siegħa biex tkun possibbli l-karatterizzazzjoni xierqa tal-profil ta' l-assorbiment. Ladarba l-integrità tal-ġilda tista' tibda tiddeterjora wara 24 siegħa, il-hinijiet tat-tehid tal-kampjuni normalment m'għandhomx jeċċedu 24 siegħa. Għas-sustanzi tat-test li jippenetraw il-ġilda malajr, dan jista' ma jkunx mehtieġ, iżda, għas-sustanzi tat-test li jippenetraw bil-mod, jistghu jkunu mehtieġa perjodi itwal. Il-frekwenza tat-tehid tal-kampjuni tal-fluwidu reċettorju għandha tippermetti lill-profil ta' l-assorbiment tas-sustanza tat-test jiġi ppreżentat grafikament.

1.4.11 Il-proċeduri terminali

Il-komponenti kollha tas-sistema tat-test għandhom jiġu analizzati u l-irkupru għandu jiġi determinat. Dan jinkludi l-kompartiment donator, it-tlahliħ tal-wieċ tal-ġilda, il-preparazzjoni tal-ġilda u l-fluwidu/kompartiment reċettorju. F'xi każijiet, il-ġilda tista' tiġi frazzjonata fil-parti espota tal-ġilda u l-parti tal-ġilda taht il-flanġa tal-ġilda, u fl-istratum corneum, l-epidermis u l-frazzjonijiet tad-dermis, għall-analiżi separata.

1.4.12 L-analiżi

Fl-istudji kollha għandu jinkiseb l-irkupru xieraq (il-mira għandha tkun medja ta' 100±10 % tar-radjoattività u kwalunkwe devjazzjoni għandha tkun iġġustifikata). L-ammont tas-sustanza tat-test fil-fluwidu reċettorju, fil-preparazzjoni tal-ġilda, fil-ħasil tal-wieċ tal-ġilda u fit-tlahliħ ta' l-apparat għandu jiġi analizzat, bl-użu ta' teknika xierqa.

▼B

2.

ID-DATA

L-analiżi tal-fluwidu reċettorju, id-distribuzzjoni tal-kimika tas-sustanza tat-test fis-sistema tat-test u l-profil ta' l-assorbiment mal-hin, għandhom jiġu ppreżentati. Meta jintużaw kundizzjonijiet ta' l-espożizzjoni għal dożi finita, il-kwantità maħsula mill-ġilda, il-kwantità assoċjata mal-ġilda (u f'saffi differenti tal-ġilda jekk analizzata) u l-ammont preżenti fil-fluwidu reċettorju (rata, u l-ammont jew perċentwal tad-doża applikata) għandhom jiġu kkal-kolati. L-assorbiment mill-ġilda jista' kultant jiġi espress bl-użu tad-data tal-fluwidu reċettorju biss. Madankollu meta s-sustanza tat-test tibqa' fil-ġilda fl-aħħar ta' l-istudju, jista' jkun mehtieg li tiġi inkluża fl-ammont totali assorbit (ara l-paragrafu 66 fir-referenza 3)). Meta jintużaw kundizzjonijiet ta' dożi infiniti ta' espożizzjoni id-data tista' tippermetti l-kalkolu ta' kostant tal-permeabilità (Kp). Taht dawn il-kundizzjonijiet ta' l-aħħar, il-perċentwal assorbit mhuwiex rilevanti.

3.

IR-RAPPORTAĠĠ

3.1.

IR-RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport għandu jinkludi r-rekwiziti stipulati fil-protokoll, inkluża ġustifikazzjoni tas-sistema tat-test użata u għandu tinkludi dawn li ġejjin:

Is-Sustanza tat-Test:

- in-natura fiżika, il-karatteristiċi fiżikokimiċi (għall-inqas il-piż molekulari u $\log P_{ow}$), safa (safa radjokimika);
- informazzjoni ta' l-identifikazzjoni (eż. lott numru);
- solubilità fi fluwidu reċettorju.

Il-preparazzjoni tat-test:

- formulazzjoni u ġustifikazzjoni ta' l-użu;
- omogeneità.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

- għejun u s-sit tal-ġilda, il-metodu tal-preparazzjoni, il-kundizzjonijiet tal-ħażna qabel l-użu, kwalunkwe trattament qabel (tindif, trattament antibjotiku, eċċ), kejl ta' l-integrità tal-ġilda, stat metaboliku, ġustifikazzjoni ta' l-użu;
- diżinn taċ-ċelloli, kompożizzjoni tal-fluwidu reċettorju, rata tat-tnixxija tal-fluwidu jew hinijiet u proċeduri tat-tehid tal-kampjuni;
- dettalji ta' l-applikazzjoni f test tal-preparazzjoni tat-test u l-kwantifikazzjoni tad-doża applikata;
- kemm iddum l-espożizzjoni;
- dettalji tat-tnehhija tal-preparazzjonijiet mill-ġilda, eż. tlahlih tal-ġilda;
- dettalji ta' l-analiżi tal-ġilda u kwalunkwe teknika tal-frazzjonazzjoni użata biex tintwera d-distribuzzjoni tal-ġilda;

▼B

- proċeduri tal-ħasil taċ-ċelloli u tat-tagħmir;
- metodi ta' l-esperimenti, tekniċi ta' l-estrazzjoni, limiti ta' l-iskoperta u validazzjoni analitika tal-metodu.

Riżultati:

- irkupru totali ta' l-esperiment (Doża applikata $\equiv$ Hasil tal-ġilda + Ġilda + Fluwidu reċettur + Hasil taċ-Ċelloli);
- tabulazzjoni ta' l-irkupru individwali taċ-ċelloli f'kull kompartiment;
- profil ta' l-assorbiment;
- data tabulata dwar l-assorbiment (espressa b'ħala rata, ammont jew percentwal).

Diskussjoni tar-riżultati.

Kunklużjonijiet.

4.

REFERENZI

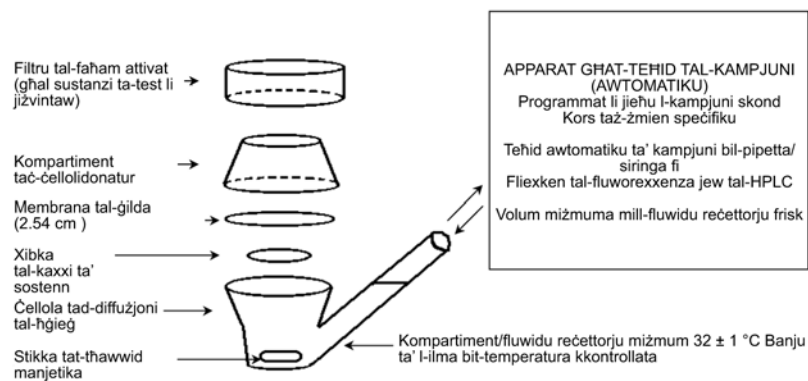
1. Metodu tat-Test B.44. L-Assorbiment tal-Ġilda: Metodu *In vivo*.
2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2 000)5. OECD, Paris.
4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.
6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussel.
8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191-205.
9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼ B

11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Eżempju ta' Dizinn Tipiku ta' Ċellola tad-Diffużjoni Statika għall-Istudji *in vitro* ta' l-Assorbiment Perkutanju



▼ M3

B.46. IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-EPIDERMIDE UMANA RIKOSTRUWITA

INTRODUZZJONI

1. Irritazzjoni tal-ġilda tirreferi għall-produzzjoni ta' ħsara reversibbli fil-ġilda wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test għal massimu ta' 4 s'ghat [kif iddefinit mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) u mir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-tahlitiet (1)(3)]. Dan il-Metodu ta' Ttestjar (TM) jipprovdi proċedura *in vitro* li tista' tintuża għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sustanzi kimiċi irritanti (sustanzi u tahlitiet) f'konformità mal-GHS tan-NU u l-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE (1) (2) (3). Fl-UE u f'reġjuni oħra, li ma adottawx il-Kategorija 3 (sustanzi irritanti minuri) tal-GHS tan-NU, dan it-TM jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi mhux klassifikati, jiġifieri dawk ta' "L-Ebda Kategorija" fil-GHS tan-NU u fis-CLP tal-UE (1)(3). Dan it-TM jista' jintuża sabiex jiddetermina l-irritazzjoni fuq il-ġilda tas-sustanzi kimiċi bħala test sostitut wahdieni għall-ittestjar ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vivo* fi hdan strateġija ta' ttestjar imtarrġa (il-Kapitolu 4 u l-Kapitolu B.4 f'dan l-Anness).
2. Generalment, il-valutazzjoni tal-irritazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu tal-annimali tal-laboratorju [il-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD; il-Kapitolu B.4 f'dan l-Anness] (4). Fir-rigward tal-kwistjonijiet relatati mal-benesseri tal-annimali, il-B.4 ġie rivedut fl-2004 u sar jippermetti li tiġi ddeterminata l-korrużjoni/irritazzjoni tal-ġilda billi tiġi applikata strateġija ta' ttestjar imtarrġa, billi jintużaw metodi ta' ttestjar *in vitro* jew *ex vivo*, u għalhekk jiġu evitati l-uġiġh u t-tbatija tal-annimali. Tliet metodi ta' ttestjar *in vitro* validati ġew adottati bħala Linji Gwida 430, 431 u 435 (5) (6) (7) tat-Test tal-OECD u tnejn minnhom bħala l-Kapitolu B.40 u B.40bis ta' dan l-Anness, li għandhom jintużaw għall-parti korrużiva tal-istrateġija ta' ttestjar imtarrġa tal-B.4 jew tal-Linja Gwida (4) tat-Test tal-OECD.
3. Dan it-TM jindirizza l-irritazzjoni tal-ġilda tal-punt tat-tmiem tas-saħha umana. Huwa bbażat fuq epidermide umana rikostrowita (RhE— Reconstructed human Epidermis), li fid-disinn globali tagħha (l-użu tal-keratinoċiti mhux trasformati minn mill-epidermide umana bħala sors taċ-ċelloli u l-użu ta' tessuti u ċitoarkitektura rappreżentattivi) tixbah hafna lill-karatteristiċi bijokimiċi u fiżjoloġiċi tas-saffi tal-wieċ tal-ġilda umana, jiġifieri l-epidermide. Dan it-TM jinkludi wkoll sett ta' Standards ta' Prestazzjoni (Appendiċi 2) għall-valutazzjoni ta' metodi simili u modifikati bbażati fuq l-RhE żviluppati mill-EC-ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) (8), f'konformità mal-prinċipji tad-Dokument ta' Gwida Nru 34 tal-OECD (9).
4. Hemm tliet metodi validati li jaderixxu ma' dan it-TM. L-istudji ta' prevalidazzjoni, l-ottimizzazzjoni u l-validazzjoni tlestew għal metodu *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), li jużaw mudell tal-RhE, disponibbli kummerċjalment bħala EpiSkin™ (iddeżinjat il-Metodu ta' Referenza Validat — VRM — Validated Reference Method). Żewġ metodi oħra tal-RhE kummerċjalment disponibbli ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* wrew riżultati simili għall-VRM skont il-validazzjoni bbażata fuq il-PS (21), u dawn huma l-metodi ta' EpiDerm™ SIT (EPI-200) u ta' SkinEthic™ RHE (22).

▼ M3

5. Qabel ma jkun jista' jintuża metodu RhE *in vitro* simili jew modifikat propost għajr il-metodi tal-RHE ta' VRM, ta' EpiDermTM SIT (EPI-200) jew ta' SkinEthicTM RHE għal skopijiet regolatorji, għandhom jiġu stabbiliti l-affidabbiltà, ir-rilevanza (preċiżjoni) u l-limitazzjonijiet tiegħu għall-użu mahsub sabiex jiġi żgurat li dan jista' jittqies bħala wiehed simili għal dak tal-VRM, skont ir-rekwiziti tal-PS stabbiliti f'dan it-TM (Appendiċi 2). Barra minn hekk, huwa rakkomandat li jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Sfond ta' Spjegazzjoni tal-OECD dwar l-ittestjar ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* qabel l-iżvilupp u l-validazzjoni ta' metodu RhE *in vitro* simili jew modifikat u qabel ma dan jiġi sottomess għal adozzjoni regolatorja (23).

DEFINIZZJONIJIET

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

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

7. Limitazzjoni tat-TM, kif muri mill-istudju ta' validazzjoni (16), huwa li dan ma jippermettix il-klassifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi għall-Kategorija 3 (sustanzi irritanti minuri) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1). Meta jintuża bħala test sostitut parzjali, jista' jkun mehtieg ittestjar *in vivo* ta' segwitu sabiex jiġi karatterizzat il-potenzjal shih ta' irritazzjoni tal-ġilda (il-Kapitolu 4 u l-Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Huwa rikonoxxut li l-użu ta' ġilda umana huwa soġġett għal konsiderazzjonijiet u kundizzjonijiet etiċi nazzjonali u internazzjonali.
8. Dan it-TM jindirizza l-komponent ta' irritazzjoni tal-ġilda *in vitro* tal-istrateġija ta' ttestjar imtarrġa tal-B.4 (Il-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD) dwar l-irritazzjoni/il-korrużjoni dermali (4). Filwaqt li dan it-TM ma jipprovdix informazzjoni adegwata dwar il-korrużjoni tal-ġilda, għandu jiġi nnotat li l-B.40 bis (Linja Gwida 431 tat-Test tal-OECD) dwar il-korrużjoni tal-ġilda huwa bbażat fuq l-istess sistema ta' ttestjar tal-RhE, għad li juża protokoll ieħor (il-Kapitolu B.40 bis). Dan il-metodu huwa bbażat fuq il-mudelli tal-RhE billi jintużaw keratinociti umani, li għaldaqstant jirrappreżenta b'mod *in vitro* l-organu fil-mira tal-ispeċi ta' interess. Barra minn hekk, dan ikopri direttament il-pass inizjali tal-katina/mekkanizmu infjammatorja/u tal-azzjoni (hsara liċ-ċelloli u lit-tessut li tirriżulta fi trawma lokalizzata) li ssehh/jsehh waqt l-irritazzjoni *in vivo*. Giet ittestjata firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hija l-baži ta' dan it-TM u l-baži ta' dejta empirika tal-istudju ta' validazzjoni kienet tammonta għal total ta' 58 sustanza kimika (16)(18)(23). Huwa applikabbli għal solidi, likwidi, semi-solidi u xama'. Il-likwidi jistgħu jkun milwiema jew mhux milwiema; is-solidi jistgħu jkun jinhallu jew ma jinhallux fl-ilma. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jintahnu fi trab fin qabel l-applikazzjoni; mhuwa mehtieg l-ebda trattament minn qabel tal-kampjun. Il-gassijiet u l-aerosols għandhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni (24). Filwaqt li huwa mifhum li dawn jistgħu jiġu ttestjati billi tintuża t-teknoloġija tal-RhE, it-TM attwali ma jippermettix l-ittestjar ta' gassijiet u aerosols. Għandu jiġi nnotat ukoll li sustanzi kimiċi ferm ikkulluriti jistgħu jinterferixxu mal-kejl tal-vijabbiltà taċ-ċellola u jehtiegu l-użu ta' kontrolli adattati għal korrezzjonijiet (ara l-paragrafi 24-26).
9. Sessjoni wahda ta' ttestjar magħmula minn tliet tessuti replikati għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati li joqorbu hafna lejn il-limitu, bħal pereżempju kejl replikat mhux konkordanti u/jew vijabbiltà tal-perċentwal medju daqs $50 \pm 5\%$, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet wahda f'każ ta' riżultati mhux konkordanti bejn l-ewwel zewġ sessjonijiet.

▼ M3

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Is-sustanza kimika tat-test hija applikata b'mod topiku għal mudell tal-RhE tridimensjonali, iġġenerata minn keratinoċiti mhux trasformati minn mill-epidermide umana, li ffurmaw ruħhom f'mudell b'diversi saffi, ferm differenzjat ta' *epidermide* umana. Din tikkonsisti f'saff tal-qiegħ, saff spinuż u saff granulari organizzati, u *stratum corneum* b'diversi saffi li jkun fih saffi lipidi lamellari interċellulari li jirrappreżentaw il-klassijiet lipidi ewlenin b'mod analoġu għal dawk li jinstabu *in vivo*.
11. Irritazzjoni tal-ġilda pprovokata minn sustanzi kimiċi, murija permezz ta' eritema u edema, hija r-riżultat ta' katina ta' avvenimenti li bdew mill-penetrazzjoni tal-*istratum corneum* u l-ħsara lis-saffi ta' taħt il-keratinoċiti. Il-keratinoċiti li jkunu qed imutu jirrilaxxaw medjaturi li jibdew il-katina infjammatorja li jaġixxu fuq iċ-ċelloli fid-*dermis*, b'mod partikolari ċ-ċelloli stromali u endoteljali. Hija d-dilatazzjoni u l-permeabilità akbar ta' ċ-ċelloli endoteljali li jipproduċu l-eritema u l-edema osservati (24). Il-metodi bbażati fuq l-RhE jkeġġu l-avvenimenti tal-bidu tal-katina.
12. Il-vijabbiltà ta' ċ-ċelloli fil-mudelli tal-RhE titkejjel minn konverżjoni enzimika tal-kulur vitali MTT [3-(4,5-Dimetiltijazol-2-il)-2,5-bromur tad-difeniltetrazolu, Thiazolyl blu; numru tal-CAS 298-93-1 f'melħ formażan blu li huwa mkejjel b'mod kwantitattiv wara l-estrazzjoni mit-tessuti (25). Sustanzi kimiċi huma identifikati mill-abbiltà tagħhom li jnaqqsu l-vijabbiltà ta' ċ-ċellola taħt il-livelli massimi definiti (jiġifieri $\leq 50\%$, għall-GHS tan-NU/Kategorija 2 tas-CLP tal-UE). Skont il-qafas regolatorju li fih jintużaw ir-riżultati ta' dan it-TM, is-sustanzi kimiċi li jipproduċu vijabbiltajiet ta' ċ-ċellola oghla mil-livell massimu definit, jistgħu jitqiesu bħala mhux irritanti (jiġifieri $> 50\%$, L-Ebda Kategorija).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

13. Qabel l-użu ta' rutina ta' kwalunkwe mit-tliet metodi validati li jaderixxu ma' dan it-TM, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika, billi jużaw l-għaxar Sustanzi Kimiċi ta' Referenza elenkati fit-Tabella 1. Għal metodi simili żviluppati skont dan it-TM jew għal modifiki ta' kwalunkwe mit-tliet metodi validati, għandhom jiġu ssodisfati r-rekwiziti tal-PS spjegati fl-Appendiċi 2 ta' dan it-TM qabel ma jintuża l-metodu għall-ittestjar regolatorju.
14. Bħala parti mill-eżerċizzju tal-profiċjenza, huwa rrakkomandat li l-utent jivverifika l-karatteristiċi ta' protezzjoni tat-tessuti wara li dawn jiġu riċevuti kif speċifikat mill-produttur tal-mudell tal-RhE. Dan huwa ta' importanza partikolari jekk it-tessuti jintbagħtu minn distanzi twal jew jekk idumu biex jaslu. Ladarba metodu jkun ġie stabbilit b'suċċess u tkun intweriet profiċjenza fl-użu tiegħu, verifika bħal din ma għandhiex tkun meħtieġa fuq bażi ta' rutina. Madankollu, meta jintuża metodu b'rutina, huwa rrakkomandat li jibqgħu jiġu vvalutati l-karatteristiċi ta' protezzjoni f'intervalli regolari.

Tabella 1

Sustanzi Kimiċi ta' Referenza ⁽¹⁾

Sustanza Kimika	Nru tal-CAS	Riżultat <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Stat fiżiku	GHS tan-NU/Kategorija tas-CLP tal-UE
aċidu naftilaċetiku	86-87-3	0	Solidu	L-ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Likwidu	L-ebda Kat.

▼ M3

Sustanza Kimika	Nru tal-CAS	Riżultat <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Stat fiżiku	GHS tan-NU/Kategorija tas-CLP tal-UE
stearate tal-metil	112-61-8	1	Solidu	L-ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	1,7	Likwidu	L-ebda Kat. (Kat. 3 fakultattiva) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
salicilat tal-eżil	6259-76-3	2	Likwidu	L-ebda Kat. (Kat. 3 fakultattiva) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
ċiklamen tal-aldeid	103-95-7	2,3	Likwidu	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	2,7	Likwidu	Kat. 2
idrossidu tal-potassju (5 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	3	Likwidu	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	3,3	Solidu	Kat. 2
Ettanal	111-71-7	3,4	Likwidu	Kat. 2

⁽¹⁾ Dawn is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza huma sottosett tas-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza użati fl-istudju ta' validazzjoni.

⁽²⁾ Ir-riżultat *in vivo* skont il-B.4 u l-Linja Gwida 404 tat-Test tal-OECD (4).

⁽³⁾ Taht dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-Kategorija 3 (irritanti minuri) fakultattiva tal-GHS tan-NU (1) hija meqjusa bħala L-Ebda Kategorija.

⁽⁴⁾ Il-Kategorija 3 fakultattiva tal-GHS tan-NU mhijiex applikabbli skont is-CLP tal-UE.

PROCEDURA

15. Din li ġejja hija deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ta' metodu tal-RhE għal eżami ta' irritazzjoni tal-ġilda. Mudell tal-RhE għandu jiġi rikostitwit, u jista' jiġi jgħanna mill-persunal impjegat jew inkella miksub b'mod kummerċjali. Hemm disponibbli proċeduri Standard ta' Operat (SOPs—Standard Operating Procedures) għal EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) u SkinEthic™ RHE (26)(27)(28). L-ittestjar għandu jitwettagħ skont dawn li ġejjin:

Komponenti tal-Metodu ta' ttestjar tal-RhE

Kundizzjonijiet ġenerali

16. Keratinociti umani mhux trasformati għandhom jintużaw sabiex jerġgħu jibnu l-epitelju. Is-saffi multipli ta' ċelloli epitelji vijabbli (saff tal-qiegh, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) għandhom ikunu preżenti taht *stratum corneum* funzjonali. L-*istratum corneum* għandu jkollu saffi multipli li jkun fihom il-profil lipidu essenzjali sabiex jipproduċu protezzjoni funzjonali robusta sabiex tirreżisti l-penetrazzjoni rapida ta' sustanzi kimiċi markaturi ċitotossici, pereżempju dodecilsulfat tas-sodju (SDS — Sodium Dodecyl Sulphate) jew Triton X-100. Il-funzjoni ta' protezzjoni għandha tintwera u tista' tiġi eżaminata jew permezz ta' determinazzjoni tal-konċentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika markatriċi tnaqqas il-vijabbiltà tat-tessuti b'50 % (IC₅₀) wara ħin ta' esponiment fiss, jew permezz ta' determinazzjoni tal-ħin ta' esponiment mehtiegħ sabiex il-vijabbiltà taċ-ċellola titnaqqas b'50 % (ET₅₀) wara l-applikazzjoni tas-sustanza kimika markatriċi b'konċentrazzjoni speċifika u fissa. Il-karatteristiċi ta' trażzin tal-mudell tal-RhE għandhom iwaqqfu l-passaġġ ta' materjal madwar l-*istratum corneum* għat-tessut vijabbli, li nkella jwassal għal immudellar ta' livell baxx tal-esponiment tal-ġilda. Il-mudell tal-RhE għandu jkun hieles minn kontaminazzjoni minn batterji, vajrusijiet, majkoplasma, jew fungi.

▼ M3

Kundizzjonijiet funzjonali

Vijabbiltà

17. L-analizi użata għad-determinazzjoni tad-daqs tal-vijabbiltà hija l-analizi tal-MTT (25). L-utenti tal-mudell tal-RhE għandhom jiżguraw li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji definiti għall-kontroll negattiv (NC — Negative Control). Id-densità ottika (OD — Optical Density) tas-solvent ta' estrazzjoni waħedha għandha tkun żgħira biżżejjed, jiġifieri $OD < 0,1$. Firxa ta' aċċettabilità (l-ogħla limitu jew il-limitu inferjuri) għall-valuri tal-OD ta' kontroll negattiv (fil-kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar ta' Irritazzjoni tal-Gilda) hija stabbilita mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE, u l-firxiet ta' aċċettabilità għat-tliet metodi validati huma pprovduti fit-Tabella 2. Għandu jiġi dokumentat li t-tessuti ttrattati bl-NC huma stabbli fil-kultura (jipprovdur kejl tal-vijabbiltà simili) sakemm idum il-perjodu tat-test ta' esponiment.

Tabella 2

Firxiet ta' aċċettabilità għall-valuri negattivi tal-OD ta' kontroll

	Limitu inferjuri ta' aċċettabilità	L-ogħla limitu ta' aċċettabilità
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 1,0$	$\leq 2,5$
SkinEthic™ RHE	$\geq 1,2$	$\leq 2,5$

Funzjoni ta' protezzjoni

18. L-*istratum corneum* u l-kompożizzjoni lipida tiegħu għandhom ikunu biżżejjed sabiex jirreżistu l-penetrazzjoni rapida tas-sustanzi kimiċi markaturi ċitotossici, eżempju SDS jew Triton X-100, kif stmat minn IC_{50} jew ET_{50} (Tabella 3).

Morfoloġija

19. Għandu jitwettaq eżami istoloġiku tal-mudell tal-RhE li juri struttura li tixbah lill-*epidermide* umana (inkluż l-*istratum corneum* b'saffi multipli).

Riproduċibbiltà

20. Ir-riżultati tas-sustanza kimika ta' kontroll pożittiv (PC – Positive Control) u l-kontrolli negattivi (NC) tal-metodu ta' ttestjar għandhom juru riproduttibilità maz-żmien.

Kontroll tal-kwalità (QC – Quality Control)

21. L-iżviluppatur/il-fornitur tal-mudell tal-RhE għandu jiżgura u juri li kull lott mill-mudell tal-RhE użat jissodisfa l-kriterji tat-tnedija tal-produzzjoni definiti, fosthom dawk għall-*vijabbiltà* (paragrafu 17), il-*funzjoni ta' protezzjoni* (paragrafu 18) u l-*morfoloġija* (paragrafu 19) huma l-aktar rilevanti. Din id-dejta għandha tiġi pprovduta lill-utenti tal-metodu, sabiex ikunu jistgħu jinkludu din l-informazzjoni fir-rapport tat-test. Firxa ta' aċċettabilità (l-ogħla limitu jew il-limitu inferjuri) għall- IC_{50} jew għall- ET_{50} għandhom jiġu stabbiliti mill-iżviluppatur/fornitur tal-mudell tal-RhE (jew l-investigatur meta jintuza l-mudell imfassal mill-persunal imhaddem). Dawk ir-riżultati li huma prodotti b'tessuti kkwalifikati biss jistgħu jiġu aċċettati għal tbassir affidabbli ta' klassifikazzjoni ta' irritazzjoni. Bhal pereżempju, il-firxiet ta' aċċettabilità għat-tliet metodi validati huma pprovduti fit-Tabella 3.

▼ M3

Tabella 3

Eżempji ta' kriterji tal-QC ta' rilaxx tal-lott

	Limitu inferjuri ta' aċċettabilità	L-oghla limitu ta' aċċettabilità
EpiSkin™ (SM) (trattament ta' 18-il siegħa b' SDS) (26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET ₅₀ = 4,8 hr	ET ₅₀ = 8,7 hr
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 hr	ET ₅₀ = 9,0 hr

Applikazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi tat-Test u ta' Kontroll

22. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Għal-likwidi kif ukoll għas-solidi, għandu jiġi applikat ammont suffiċjenti ta' sustanza kimika tat-test sabiex ikopri b'mod uniformi l-wiċċ tal-*epidermide* filwaqt li tiġi evitata doża infinita, jiġifieri għandu jintuża minimu ta' 25 µL/cm² jew 25 mg/cm². Għal solidi, il-wiċċ tal-*epidermide* għandu jixxarrab b'ilma dejonizzat jew distillat qabel l-applikazzjoni, sabiex jitjieb il-kuntatt bejn is-sustanza kimika tat-test u l-wiċċ tal-*epidermide*. Kull meta dan ikun possibbli, is-solidi għandhom jiġu ttestjati bħala trab fin. Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test għandha tinhasel bir-reqqa mill-wiċċ tal-*epidermide* b'bafer milwiem, jew b'0,9 % NaCl. Skont liema wiehed mit-tliet metodi tal-RhE validati jintuża, il-perjodu ta' esponiment ivarja bejn 15-il minuta u 60 minuta, u t-temperatura ta' inkubazzjoni bejn 20 u 37 °C. Dawn il-perjodi u t-temperaturi ta' esponiment huma ottimizzati għal kull metodu tal-RhE u jirrappreżentaw karatteristiċi intrinseċi differenti tal-metodi, iżda għad-dettalji ara l-Proċeduri Standard ta' Operazzjoni (SOPs) għall-metodi (26)(27)(28).

23. F'kull sessjoni għandhom jintużaw NC u PC simultanja sabiex juru li l-vijabbiltà (mal-NC), il-funzjoni ta' protezzjoni u s-sensittività tat-tessut li tirriżulta (mal-PC) tat-tessuti huma fi hdan firxa ta' aċċettabilità storika definita. Il-PC issuggerit huwa ta' SDS 5 % milwiemi. Is-sustanzi kimiċi tal-NC huma ilma jew ilma bil-melħ ibbaferjat bil-fosfat (PBS — Phosphate Buffered Saline).

Kejl tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

24. L-aktar element importanti tal-proċedura tat-test huwa li l-kejl tal-vijabbiltà ma jsirx immedjatament wara l-esponiment għas-sustanzi kimiċi tat-test, iżda wara perjodu, ta' inkubazzjoni ta' wara t-trattament tat-tessuti mlahalha f'mezz ġdid, twil biżżejjed. Dan il-perjodu jippermetti kemm l-irkupru minn effetti ċitotossiċi dgħajfa kif ukoll il-manifestazzjoni tal-effetti ċitotossiċi b'mod ċar. Il-fażi ta' ottimizzazzjoni tat-test (11) (12) (13) (14) (15) uriet li perjodu ta' inkubazzjoni ta' 42 siegħa wara t-trattament kien wiehed ottimali.

25. L-analizi MTT hija metodu kwantitattiv validat li għandu jintuża sabiex ikejjel il-vijabbiltà taċ-ċellola taht dan it-TM. Hija kompatibbli mal-użu f'bini ta' tessut tridimensjonali. Il-kampjun tat-tessut jitqiegħed f'soluzzjoni MTT b'konċentrazzjoni xierqa (eżempju 0,3 — 1 mg/mL) għal 3 sigħat. Imbagħad, il-prodott fromaġan blu preċipitat jiġi estratt mit-tessut billi jintuża solvent (eżempju isopropanol, isopropanol aċiduż), u l-konċentrazzjoni tal-formaġan titkejjel billi tiġi determinata l-OD ta' 570 nm billi jintuża filtru ta' faxx ta' frekwenza ta' massimu ta' ± 30 nm.

▼ M3

26. Il-karatteristiċi ottiċi tas-sustanza kimika ta' ttestjar jew l-azzjoni kimika tagħha fuq l-MTT jistgħu jinterferixxu mal-analiżi u dan iwassal għal stima falza tal-vijabbiltà (għax is-sustanza kimika tat-test tista' tipprevjeni jew treggħa' lura l-ġenerazzjoni tal-kulur kif ukoll tikkawża). Dan jista' jsehh meta sustanza kimika tat-test speċifika ma titneħhiex kompletament mit-tessut bi tlaħliħ jew meta din tippenetra l-*epidermide*. Jekk sustanza kimika tat-test taġixxi direttament fuq l-MTT (tnaqqas l-MTT), ikollha kulur naturali, jew issir ikkulurita matul it-trattament tat-tessut, għandhom jintużaw kontrolli addizzjonali sabiex jiġu identifikati u kkoreġuti l-interferenzi tas-sustanzi kimiċi tat-test mat-teknika ta' kejl tal-vijabbiltà. Spjegazzjoni dettaljata dwar kif għandhom jiġu kkoreġuti tnaqqis u interferenzi diretti tal-MTT permezz ta' aġenti li jagħtu l-kulur hija disponibbli fl-SOPs għat-tliet metodi validati (26)(27)(28).

Kriterji ta' aċċettabiltà

27. Għal kull metodu li juża lottijiet tal-mudell tal-RhE validi (ara l-paragrafu 21), it-tessuti ttrattati bl-NC għandhom jimmanifestaw OD li tirrifletti l-kwalità tat-tessuti li segwew il-passi ta' kunsinna u riċevuta u l-proċessi kollha tal-protokoll. Valuri ta' kontroll tal-OD ma għandhomx ikunu aktar baxxi mil-limiti storikament stabbiliti. B'mod simili, it-tessuti ttrattati bil-PC, jiġifieri SDS 5 % milwiema, għandhom jirriflettu l-abbiltà tagħhom li jirreaġixxu għal sustanza kimika irritanti taħt il-kundizzjonijiet tat-TM (26) (27) (28). Għandhom jiġu ddefiniti l-miżuri assoċjati u adattati ta' varjabbiltà bejn ir-replikati tat-tessuti (eżempju jekk jintużaw devjazzjonijiet standard (SD — Standard Deviations) dawn għandhom ikunu fi hdan l-intervall ta' tolleranza unilaterali ta' 95 % ikkalkolat mid-dejta storika; għall-SD tal-VRM < 18 %).

Interpretazzjoni tal-Mudell tar-Riżultati u Tbassir

28. Il-valuri tal-OD miksuba minn kull sustanza kimika tat-test jistgħu jintużaw sabiex jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' vijabbiltà normalizzat għall-NC, li huwa stabbilit għal 100 %. Il-valur ta' limitu ta' perċentwal tal-vijabbiltà ta' ċellola li jiddistingwi sustanzi kimiċi tat-test irritanti minn dawk mhux klassifikati u l-proċedura/i statistika/statistiċi użata/i sabiex jiġu evalwati r-riżultati u jiġu identifikati s-sustanzi kimiċi irritanti għandhom jiġu ddefiniti u dokumentati b'mod ċar u għandu jintwera li dawn huma xierqa. Il-valuri ta' limitu għat-tbassir tal-irritazzjoni huma pprovduti hawn taħt:

- Is-sustanza kimika tat-test hija kkunsidrata bħala irritanti għall-ġilda skont il-GHS tan-NU/il-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE jekk il-vijabbiltà tat-tessut wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun inqas minn jew daqs ($\leq$) 50 %,
 - Skont il-qafas regolatorju li fih jintużaw ir-riżultati ta' dan it-TM, is-sustanza kimika tat-test tista' titqies bħala mhux irritanti għall-ġilda skont L-Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU/is-CLP tal-UE jekk il-vijabbiltà tat-tessut wara l-esponiment u l-inkubazzjoni ta' wara t-trattament tkun aktar minn ($>$) 50 %.

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

29. Għal kull sessjoni, dejta minn tessuti replikati individwali (pereżempju valuri tal-OD u dejta dwar il-perċentwal ikkalkolat ta' vijabbiltà taċ-ċellola għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma tabulari, inkluża d-dejta minn esperimenti ripetuti, kif ikun xieraq. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-SD $\pm$ medji għal kull sessjoni. Interazzjonijiet osservati mar-reagent u s-sustanzi kimiċi tat-test ikkuluriti tal-MTT għandhom jiġu rrapportati għal kull sustanza kimika ttestjata.

▼ M3*Rapport tat-test*

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

Sustanzi Kimiċi tat-Test u ta' Kontroll:

- L-isem/l-ismijiet tas-sustanzi kimiċi bhall-isem u n-numru tal-CAS, l-isem u n-numru tal-KE, jekk dawn ikunu magħrufa,
- Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza kimika (f'perċentwal(i) skont il-piż),
- Karatteristiċi fiżiċi/kimiċi rilevanti għat-tweqqi tal-istudju (perezempju l-istat fiżiku, l-istabbiltà, il-volatilità, il-pH u s-solubilità fl-ilma jekk dawn ikunu magħrufa),
- Trattament tas-sustanzi kimiċi tat-test/ta' kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (perezempju tishin, thin),
- Kundizzjonijiet ta' ħzin.

Ġustifikazzjoni tal-mudell tal-RhE u tal-protokoll użati

Kundizzjonijiet tat-Test:

- Sistema ta' ċelloli użati;
- Informazzjoni ta' appoġġ kompluta għall-mudell tal-RhE speċifiku użat inkluża l-prestazzjoni tiegħu. Din l-informazzjoni għandha tiġi inkluża, iżda ma għandhiex tkun limitata għal dawn:
 - i) vijabbiltà;
 - ii) funzjoni ta' protezzjoni;
 - iii) morfologija;
 - iv) riproduttività u prevedibilità;
 - v) Kontrolli tal-kwalità (QC) tal-mudell,
- Dettalji tal-proċedura tat-test użata,
- Dożi tat-test użati, dewmien tal-esponiment u l-perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament,
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test,
- Referenza għad-dejta storika tal-mudell. Din għandha tinkludi, iżda ma għandhiex tkun limitata għal:
 - i) aċċettabilità tad-dejta tal-QC b'referenza għad-dejta storika tal-lottijiet;
 - ii) aċċettabilità tal-valuri ta' kontroll pożittivi u negattivi b'referenza għall-mezzi u l-meded ta' kontroll pożittivi u negattivi,
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati, inkluża l-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-punt (i) ta' limitu għall-mudell ta' tbassir,
- Referenza għad-dejta storika ta' kontroll.

▼ **M3**

Riżultati:

- Tqassim tad-dejta f'forma tabulari minn sustanzi kimiċi tat-test individwali għal kull sessjoni u għal kull kejl ta' replika,
- Indikazzjoni tal-kontrolli użati għal sustanzi kimiċi diretti li jnaqqsu l-MTT u/jew sustanzi kimiċi tat-test li jerhu l-kulur,
- Deskrizzjoni ta' effetti oħra osservati.

Diskussjoni dwar ir-riżultati

Konkluzjoni

LETTERATURA

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Tjelet edizzjoni riveduta, UN New York and Geneva. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- (2) EC-ECVAM (2009), Statement on the “Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards”, mahruġ mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC30), 9 ta' April 2009. Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikkettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-taħlitiet, li jemenda u jhassar id-Direttivi 67/548/KEE u 1999/45/KE, u li jemenda r-Regolament (KE) Nru 1907/2006. ĠU L 353, 31.12.2008, p. 1.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 404, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 430, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 431, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals Nru 435, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) KE-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment Nru 34, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. u Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57–93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. u Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

▼ M3

- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. u Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. u Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests — An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351–367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. u Rubinstein, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329–349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. u Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109–129.
- (16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559–601.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. u Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603–619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tesson-neaud, E. u Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy — Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351–358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 ta' Novembru 2008. Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, Nru 137, OECD, Parigi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. u Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231–243.

▼ **M3**

- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Verżjoni 1.8 (Frar 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min — 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDerm™ SOP, Verżjoni 7.0 (Riveduta Marzu 2009), Protokoll għal: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Verżjoni 2.0 (Frar 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Disponibbli fuq: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., u Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: *Practical Contact Dermatitis*, pp 7–18, (Ed. Guin J. D.). McGraw-Hill, New York.
- (30) Id-Direttiva tal-kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li taddatta għall-progess tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill 67/548/KEE rigward l-approssimazzjoni tal-liġijiet, tar-regolamenti u tad-dispożizzjonijiet amministrattivi dwar il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar ta' sustanzi perikolużi, ĠU L 225, 21.8.2001, p. 1.
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. u Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1–4.
- (32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. u Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, *ALTEX*, 14, 359–365.
- (33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. u Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109–116.

▼ M3

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Preciżjoni: Il-viċinanza tal-qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija mizura ta' prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u aspett wiehed ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (14).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bhala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Limitu stmat ta' konċentrazzjoni (ECt): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni li huwa indikattiv ta' rispons pożittiv.

Konċentrazzjoni stmata ta' tlieta (EC3): Konċentrazzjoni stmata ta' sustanza tat-test meħtieġa sabiex jiġi prodott indiċi ta' stimolazzjoni ta' tlieta.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata hażin bhala negattiv jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata hażin bhala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà interlaboratorja: Kejl sa fejn il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà interlaboratorja hija determinata matul il-proċessi ta' validazzjoni u ta' validazzjoni minn qabel, u tindika sa fejn test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u tissejjah ukoll riproduttibilità bejn laboratorji (14).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi hdan l-istess laboratorju jista' jirnexxihom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjah ukoll riproduttibilità fi hdan il-laboratorju (14).

Test "me-too": Espressjoni li tingħad fit-taħdit komuni għal metodu ta' ttestjar li huwa strutturalment u funzjonalment simili għal metodu ta' ttestjar ta' referenza validat u aċċettat. Metodu ta' ttestjar bħal dan ikun kandidat għal validazzjoni rapida ("catch-up validation"). Jintuża b'mod alternanti ma' metodu ta' ttestjar simili (14).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħra f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Standards ta' Prestazzjoni (PS): Standards, ibbażati fuq metodu ta' ttestjar validu, li jipprovdut bazi għall-evalwazzjoni tal-komparabbiltà ta' metodu ta' ttestjar propost li huwa simili b'mod funzjonali u mekkanistiku. Hemm inkluzi; (i) komponenti essenzjali tal-metodi ta' ttestjar; (ii) lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza magħżula minn fost is-sustanzi kimiċi użati sabiex tintwera l-prestazzjoni aċċettabbli tal-metodu ta' ttestjar validat; u (iii) il-livelli simili ta' preciżjoni u affidabbiltà, ibbażati fuq x'inkiseb għall-metodu ta' ttestjar validat, li l-metodu ta' ttestjar propost għandu juri meta jiġi evalwat billi tintuża l-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza (14).

▼ **M3**

Metodu ta' ttestjar ta' speċjalità: Metodu ta' ttestjar li l-manifattura u d-distribuzzjoni tiegħu huma ristretti minn privattivi, drittijiet tal-awtur, marki kummerċjali, eċċ.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li skontu l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' zamma tar-rekords u l-preċiżjoni tat-trasferiment tad-dejta jiġu vvalutati minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Sustanzi kimiċi ta' referenza: Sustanzi kimiċi magħżula għall-użu fil-proċess ta' validazzjoni, li għalihom huma diġà magħrufa r-reazzjonijiet fis-sistema ta' ttestjar ta' referenza *in vitro* jew *in vivo* jew l-ispeċi ta' interess. Dawn is-sustanzi kimiċi għandhom ikunu rappreżentanti tal-klassijiet ta' sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni jintuża l-metodu ta' ttestjar, u dawn għandhom jirrappreżentaw il-firxa shiħa ta' reazzjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mis-sustanzi kimiċi li għalihom huwa mistenni li jintuża dan il-metodu ta' ttestjar, minn qawwija, għal dgħajfa, sa negattivi. Settijiet differenti ta' sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu meħtieġa għall-istadji differenti tal-proċess ta' validazzjoni, u għal metodi ta' ttestjar u użi tat-testijiet differenti (14).

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-konsiderazzjoni tal-preċiżjon (konkordanza) ta' metodu ta' ttestjar (14).

Affidabbiltà: Kejl li jiddetermina kemm il-metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fi hdan u bejn il-laboratorji maż-żmien, meta dan jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din hija eżaminata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà intralaboratorja u dik interlaboratorja (14).

Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jiffaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allergen kimiku induttur, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jeżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dik fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li hija msemmija wkoll sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

Metodu ta' ttestjar validat: Metodu ta' ttestjar li għalih tlestew studji ta' validazzjoni sabiex jiġu ddeterminati r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabbiltà għal skop speċifiku. Huwa importanti li jiġi osservat li metodu ta' ttestjar validat jista' ma jkollux prestazzjoni suffiċjenti f'termini ta' preċiżjoni u affidabbiltà sabiex jitqies aċċettabbli għall-iskop propost (14).

▼ M3

Appendiċi 2

Standards ta' prestazzjoni għall-valutazzjoni ta' metodi ta' *epidermis* umana rikostitwita (RhE) *in vitro* simili jew immodifikati proposti għall-irritazzjoni tal-ġilda

INTRODUZZJONI

1. L-għan tal-Istandards tal-Prestazzjoni (PS) huwa li tiġi kkomunikata l-bażi li permezz tagħha metodi godda, kemm proprjetarji (jiġifieri, bi drittijiet tal-awtur, b'marka kummerċjali, irregistrati) kif ukoll mhux proprjetarji jistgħu jitqiesu li għandhom preċiżjoni u affidabbiltà suffiċjenti għal skopijiet speċifiċi ta' ttestjar. Dawn il-PS, ibbażati fuq metodi vvalidati u aċċettati, jistgħu jintużaw għall-evalwazzjoni tal-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodi analogi oħrajn (magħrufin bħala testijiet "me-too") li huma bbażati fuq prinċipji xjentifiċi simili u jkejlu jew ibassru l-istess effett bijoloġiku jew tossiku (9).
2. Qabel l-adozzjoni ta' metodi mmodifikati, jiġifieri titjib potenzjali propost ta' metodu approvat, għandu jkun hemm evalwazzjoni sabiex ikun stabbilit l-effett tal-bidliet proposti fuq ir-rendiment tat-test u sa liema punt dawn il-bidliet jaffettwaw l-informazzjoni disponibbli għall-komponenti l-oħrajn tal-proċess ta' validazzjoni. Skont l-għadd u t-tip ta' bidliet proposti, id-dejta ġġenerata u d-dokumentazzjoni ta' appoġġ għal dawk il-bidliet, dawn jew għandhom ikunu soġġetti għall-istess proċess ta' validazzjoni kif deskritt għal test ġdid, kif ukoll, jekk xieraq, għal evalwazzjoni limitata tal-affidabbiltà u r-rilevanza permezz ta' PS stabbiliti (9).
3. Metodi simili (me-too) jew immodifikati ta' kwalunkwe wieħed mit-tliet metodi vvalidati [EpiSkin™ (Metodu ta' Referenza Vvalidat (Validated Reference Method — VRM)), EpiDerm™ SIT (EPI-200) u SkinEthic™ RHE] proposti għall-użu taht dan it-TM għandhom jiġu evalwati sabiex jiġu stabbiliti l-affidabbiltà u l-preċiżjoni tagħhom permezz ta' sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw il-firxa shiħa tal-punteġġi ta' irritazzjoni Draize. Meta jiġu evalwati permezz tal-20 Sustanza kimika ta' Referenza rrakkomandati tal-PS (Tabella 1), il-metodi simili jew immodifikati proposti għandu jkollhom valuri ta' affidabbiltà u preċiżjoni li jkunu komparabbli jew aqwa minn dawk li hargu mill-VRM (Tabella 2) (2) (16). Il-valuri ta' affidabbiltà u preċiżjoni li għandhom jinkisbu huma pprovduti fil-paragrafi 8 sa 12 ta' dan l-Appendiċi. Sustanzi kimiċi mhux ikklassifikati (Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) u kklassifikati (Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP) (1), li jirrappreżentaw klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi huma inklużi, sabiex l-affidabbiltà u l-preċiżjoni (is-sensittività, l-ispeċifità u l-preċiżjoni ġenerali) tal-metodu propost jistgħu jitqabblu ma' dawk tal-VRM. L-affidabbiltà tal-metodu, kif ukoll il-kapaċità tiegħu li jidentifika tajjeb sustanzi kimiċi irritanti fil-Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP u, skont il-qafas regolatorju li għalih tiġi prodotta d-dejta, il-kapaċità tiegħu wkoll li jidentifika tajjeb sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP (għandha tiġi stabbilita qabel l-użu tiegħu għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi tat-test godda.
4. Dawn il-PS huma bbażati fuq il-PS tal-EC-ECVAM (8), aġġornati skont is-sistemi dwar il-klassifikazzjoni u t-tikkettar tal-UN GHS u tal-EU CLP (1) (3). Il-PS originali kienu definiti wara li tlesta l-istudju ta' validazzjoni (21) u kienu bbażati fuq is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-UE kif stipulata fid-Direttiva tal-Kummissjoni 2001/59/KE tas-6 ta' Awwissu 2001 li tadatta għall-progress

▼ M3

tekniku għat-28 darba d-Direttiva tal-Kunsill Nru 67/548/KEE dwar l-approssimazzjoni tal-ligijiet, ir-regolamenti u d-dispożizzjonijiet amministrattivi rigward il-klassifikazzjoni, l-imballaġġ u l-ittikkettjar tas-sustanzi perikolużi ⁽¹⁾. Minhabba l-adozzjoni tas-sistema UN GHS għall-klassifikazzjoni u t-tikkettjar fl-UE (EU CLP) (3), li seħhet bejn il-finalizzazzjoni tal-istudju ta' validazzjoni u t-tlestija ta' dan it-TM, il-PS ġew aġġornati (8). Dan l-aġġornament jirrigwarda l-aktar il-bidliet (i), fis-sett ta' PS għas-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza; u (ii), il-valuri definiti ta' affidabbiltà u preċiżjoni (2) (23).

STANDARDS TA' PRESTAZZJONI GĦAL METODI TA' TTESTJAR *IN VITRO* TAL-RhE GĦALL-IRRITAZZJONI TAL-ĠILDA

5. Il-PS jinkludi dawn it-tliet elementi (9):

I) Komponenti Essenzjali tal-Metodu ta' Ttestjar

II) Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza

III) Valuri Definiti ta' Affidabbiltà u Preċiżjoni

I) Komponenti Essenzjali tal-Metodu ta' Ttestjar

6. Dawn jikkonsistu f'elementi essenzjali strutturali, funzjonali u proċedurali ta' metodu vvalidat li għandhom ikunu inkluzi fil-protokoll ta' metodu mekkanikament u funzjonalment simili jew immodifikat propost. Dawn il-komponenti jinkludu karatteristiċi uniċi tal-metodu, dettalji proċedurali kritiċi, u miżuri ta' kontroll tal-kwalità. Il-konformità mal-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar tghin sabiex tiżgura li metodu propost ieħor simili jew immodifikat ikun ibbażat fuq l-istess kunċetti bħall-VRM korrispondenti (9). Il-komponenti essenzjali tal-metodu ta' ttestjar huma deskritti fid-dettall fil-paragrafi 16 sa 21 tat-TM u l-ittestjar għandu jsir skont dan li ġej:

— Il-kundizzjonijiet generali (paragrafu 16),

— Il-kundizzjonijiet funzjonali, li jinkludu:

— vijabbiltà (paragrafu 17),

— funzjoni ta' barriera (paragrafu 18),

— morfologija (paragrafu 19),

— riproducibbiltà (paragrafu 20), u,

— kontroll tal-kwalità (paragrafu 21).

II) Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza

7. Is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza jintużaw sabiex jiġi stabbilit jekk l-affidabbiltà u l-preċiżjoni ta' metodu simili jew immodifikat propost, ippruvat li huwa strutturalment u funzjonalment simili biżżejjed għall-VRM, jew li jirrappreżenta modifika żgħira ta' wiehed mit-tliet metodi vvalidati, humiex komparabbli jew aqwa minn daww tal-VRM (2) (8) (16) (23). L-20 Sustanza Kimika ta' Referenza rrakkomandati elenkati fit-Tabella 1 jinkludu sustanzi kimiċi li jirrappreżentaw klassijiet differenti ta' sustanzi kimiċi (jiġifieri kategoriji ta' sustanzi kimiċi bbażati fuq gruppi funzjonali), u jirrappreżentaw il-firxa sħiħa ta' punteġġi ta' irritazzjoni Draize (minn xejn irritanti għal ferm irritanti) Is-sustanzi kimiċi inkluzi fil-lista jinkludu għaxar (10) sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2 tal-UN GHS/EU CLP u għaxar (10) sustanzi kimiċi mhux kategorizzati, li minnhom tlieta huma sustanzi kimiċi fakultattivi tal-Kategorija 3 tal-UN GHS. Taht dan il-Metodu ta' Ttestjar, il-Kategorija 3 fakultattiva hija meqjusa bħala Ebda Kategorija. Is-sustanzi kimiċi elenkati fit-Tabella 1 huma magħżula mis-sustanzi kimiċi użati fil-fażi ta' ottimizzazzjoni li segwiet il-prevalidazzjoni u fl-istudju tal-validazzjoni tal-VRM, fir-rigward tal-funzjonalità kimika u l-istat fiżiku (14) (18). Dawn is-Sustanzi Kimiċi ta' Referenza jirrappreżentaw l-inqas għadd ta' sustanzi

⁽¹⁾ ĠU L 225, 21.8.2001, p. 1.

▼ M3

kimiċi li għandhom jintużaw għall-evalwazzjoni tal-preċiżjoni u l-affidabbiltà ta' metodu simili jew immodifikat propost, iżda ma għandhomx jintużaw għall-iżvilupp ta' metodi ġodda. F'sitwazzjonijiet fejn sustanza kimika elenkata ma tkunx disponibbli, jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi oħrajn li għalihom hemm disponibbli dejta ta' referenza *in vivo* adegwata, prinċipalment mis-sustanzi kimiċi użati fil-fażi ta' ottimizzazzjoni li segwiet il-prevalidazzjoni u fl-istudju tal-validazzjoni tal-VRM. Jekk ikun mixtieq, sustanzi kimiċi oħrajn li jirrappreżentaw klassijiet ta' sustanzi kimiċi oħrajn u li għalihom hemm disponibbli dejta ta' referenza *in vivo* adegwata jistgħu jiżdiedu mal-lista minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza sabiex il-preċiżjoni tal-metodu propost tiġi evalwata aktar.

Tabella 1:

Lista Minima ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza għad-Determinazzjoni tal-Valuri tal-Preciżjoni u l-Affidabbiltà għal Metodi Simili jew Immodifikati ta' RhE għall-irritazzjoni tal-Ġilda ⁽¹⁾

Sustanza Kimika	Numru tal-CAS	Stat Fiżiku	Puntegġin <i>in vivo</i>	Kat. <i>in vitro</i> VRM	Kat. <i>in vivo</i> tal-UN GHS/EU CLP
1-bromo-4-klorobutan	6940-78-9	Likwidu	0	Kat. 2	Ebda Kat.
ftalat tad-dietil	84-66-2	Likwidu	0	Ebda Kat.	Ebda Kat.
aċidu naftil aċetiku	86-87-3	Solidu	0	Ebda Kat.	Ebda Kat.
fenossi aċetat tal-allil	7493-74-5	Likwidu	0,3	Ebda Kat.	Ebda Kat.
isopropanol	67-63-0	Likwidu	0,3	Ebda Kat.	Ebda Kat.
4-metil-tijo-benzaldeid	3446-89-7	Likwidu	1	Kat. 2	Ebda Kat.
stearat tal-metil	112-61-8	Solidu	1	Ebda Kat.	Ebda Kat.
butirat tal-ettil	5870-93-9	Likwidu	1,7	Ebda Kat.	Ebda Kat.
salicilat tal-eżil	6259-76-3	Likwidu	2	Ebda Kat.	Ebda Kat.
Ċinnamalaldeid	104-55-2	Likwidu	2	Kat. 2	Ebda Kat. (Kat. 3 Fakultattiva) ⁽³⁾
1-dekanol ⁽²⁾	112-30-1	Likwidu	2,3	Kat. 2	Kat. 2
aldeid taċ-ċiklamen	103-95-7	Likwidu	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromoeżan	111-25-1	Likwidu	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-klorometil-3,5-dimetil-4-metossipiridina HCl	86604-75-3	Solidu	2,7	Kat. 2	Kat. 2
disulfur tad-di-n-propil ⁽²⁾	629-19-6	Likwidu	3	Ebda Kat.	Kat. 2
idrossidu tal-potassju (5 % soluzzjoni milwiema)	1310-58-3	Likwidu	3	Kat. 2	Kat. 2
benzentijol, 5-(1,1-dimetil-letil)-2-metil	7340-90-1	Likwidu	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metil-3-fenil-1-piperazina	5271-27-2	Solidu	3,3	Kat. 2	Kat. 2

▼M3

Sustanza Kimika	Numru tal-CAS	Stat Fiziku	Puntegġin vivo	Kat. <i>in vitro</i> VRM	Kat. <i>in vivo</i> tal-UN GHS/EU CLP
Ettanal	111-71-7	Likwidu	3,4	Kat. 2	Kat. 2
Tetrakloroetilen	127-18-4	Likwidu	4	Kat. 2	Kat. 2

- (¹) L-ghazla tas-sustanzi kimiċi hija bbazata fuq il-kriterji li ġejjin: (i) is-sustanzi kimiċi huma disponibbli kummerċjalment; (ii) jirrap-prezentaw il-firxa shiha ta' punteġġi ta' irritazzjoni Draize (minn xejn irritanti għal ferm irritanti); (iii) għandhom struttura kimika definita sew; (iv) jirrapprezentaw il-funzjonalità kimika użata fil-proċess ta' validazzjoni; u (v) mhumiex assoċjati ma' profil estremament tossiku (eż. karċinoġeniċi jew tossiċi għas-sistema riproduttiva) u mhumiex assoċjati ma' spejjeż projbittivi tar-rimi.
- (²) Sustanzi kimiċi irritanti fil-fenek iżda li għalihom hemm evidenza affidabbli li mhumiex irritanti fil-bnedmin (31) (32) (33).
- (³) Taht il-UN GHS, mhux fl-EU CLP.

III) Valuri Definiti ta' Affidabbiltà u Preċiżjoni

8. Għall-finijiet tal-istabbiliment tal-affidabbiltà u r-rilevanza ta' metodi proposti simili jew immodifikati li għandhom jiġu trasferiti bejn il-laboratorji, l-20 Sustanza Kimika ta' Referenza fit-Tabella 1 għandhom jiġu ttestjati mill-inqas fi tliet laboratorji. Madankollu, jekk il-metodu propost ser jintuża f'laboratorju wiehed biss ma jkunx mehtieġ ittestjar f'diversi laboratorji għall-validazzjoni. Madankollu huwa essenzjali li dawn l-istudji ta' validazzjoni jiġu evalwati b'mod indipendenti minn entitajiet ta' validazzjoni rikonoxxuti internazzjonalment, bi qbil ma' linji gwida internazzjonali (9). F'kull laboratorju, l-20 Sustanza Kimika ta' Referenza kollha għandhom ikunu ttestjati fi tliet sensiliet ta' testijiet indipendenti magħmula b'lottijiet ta' tessut differenti u f' hinijiet spazjali biżżejjed bejniethom. Kull sensiela ta' testijiet għandha tikkonsisti minn minimu ta' tliet repliki ta' tessut ittestjati fl-istess hin għal kull sustanza kimika tat-test inkluża, NC u PC.
9. Il-kalkolu tal-valuri tal-affidabbiltà u tal-preċiżjoni tal-metodu propost għandu jsir bil-konsiderazzjoni tal-erba' kriterji hawn taht flimkien, filwaqt li jiġi żgurat li l-valuri għall-affidabbiltà u r-rilevanza jiġu kkalkulati b'mod konsistenti u definit minn qabel:
 1. Id-dejta minn sensiliet ta' testijiet minn sekwenzi shah ta' sensiliet ta' testijiet biss tikkwalifika għall-kalkolu tal-metodu u tal-varjabbiltà u l-kapaċità ta' previzjoni fil-laboratorju u bejn il-laboratorji (preċiżjoni).
 2. Il-klassifikazzjoni finali għandha tinkiseb billi jintuża l-valur medju tal-varjabbiltà fuq is-sensiliet differenti ta' sekwenza shiha ta' sensiela ta' testijiet.
 3. Id-dejta miksuba għal sustanzi kimiċi li għandhom sekwenzi shah ta' sensiliet ta' testijiet fil-laboratorji parteċipanti kollha biss tikkwalifika għall-kalkolu tal-metodu ta' varjabbiltà bejn il-laboratorji.
 4. Il-kalkolu tal-valuri ta' preċiżjoni għandu jsir fuq il-bażi ta' previzjonijiet tal-laboratorju individwali miksuba għall-20 Sustanza ta' Kimika ta' Referenza mil-laboratorji parteċipanti differenti.

F'dan il-kuntest, **sekwenza ta' sensiela ta' testijiet** tikkonsisti fi tliet sensiliet ta' testijiet indipendenti minn laboratorju wiehed għal sustanza kimika tat-test waħda. **Sekwenza shiha ta' sensiela ta' testijiet** hija sekwenza ta' sensiela ta' testijiet minn laboratorju wiehed għal sustanza kimika tat-test waħda fejn it-tliet sensiliet ta' testijiet ikunu validi. Dan ifisser li kull sensiela invalida tinvalida sekwenza shiha ta' sensiela ta' testijiet ta' tliet sensiliet.

Riproduċibbiltà fil-laboratorju

10. Il-valutazzjoni tar-riproduċibbiltà fil-laboratorju għandha turi konkordanza ta' klassifikazzjonijiet (Kategorija 2 jew Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) miksuba f'sensiliet ta' testijiet differenti u indipendenti tal-20 Sustanza Kimika ta' Referenza f'laboratorju wiehed ugħali għal jew aktar ($\geq$) minn 90 %.

▼ M3

Riproduċibbiltà bejn il-laboratorji

11. Il-valutazzjoni tar-riproduċibbiltà bejn il-laboratorji mhijiex mehtieġa jekk il-metodu propost se jintuża f'laboratorju wiehed biss. Għall-metodi li għandhom jiġu ttrasferiti bejn il-laboratorji, il-konkordanza bejn il-klassifikazzjonijiet (Kategorija 2 jew Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP) miksba f'sensiliet ta' testijiet differenti u indipendenti tal-20 Sustanza Kimika ta' Referenza preferibbilment minn mill-inqas tliet laboratorji għandha tkun uguali għal jew aktar ($\geq$) minn 80 %.

Kapaċità ta' previżjoni (preċiżjoni)

12. Il-preċiżjoni (sensittività, speċifità u preċiżjoni ġenerali) tal-metodu simili jew immodifikat propost għandha tkun komparabbli jew aqwa minn dik tal-VRM, filwaqt li tiġi kkunsidrata informazzjoni addizzjonali relatata mar-rilevanza fl-ispeċijiet ta' interess (Tabella 2). Is-sensittività għandha tkun uguali għal jew oghla ($\geq$) minn 80 % (2) (8) (23). Madankollu, hemm restrizzjoni speċifika oħra li tapplika għas-sensittività tal-metodu *in vitro* propost inkwantu żewġ sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2 *in vivo*, *1-dekanol* u *disulfur tad-di-n-propil*, jistgħu jiġu kklassifikati hażin bhala Ebda Kategorija minn aktar minn laboratorju wiehed partecipant. L-ispeċifità għandha tkun uguali għal jew oghla ($\geq$) minn 70 % (2) (8) (23). Mhemmx aktar restrizzjonijiet rigward l-ispeċifità tal-metodu *in vitro* propost, jiġifieri, kull laboratorju partecipant jista' jikklassifika hażin kwalunkwe sustanza kimika *in vivo* ta' Ebda Kategorija sakemm l-ispeċifità finali tal-metodu ta' ttestjar tkun f'firxa aċċettabbli. L-preċiżjoni ġenerali għandha tkun uguali għal jew oghla ($\geq$) minn 75 % (2) (8) (23). Għalkemm is-sensittività tal-VRM ikkalkulata għall-20 Sustanza Kimika ta' Referenza elenkati fit-Tabella 1 hija uguali għal 90 %, il-valur ta' sensittività minimu definit mehtieġ għal kwalunkwe metodu simili jew immodifikat sabiex ikun ikkunsidrat validu huwa stabbilit għal 80 % minhabba li kemm *1-dekanol* (sustanza kimika marginali) u *disulfur tad-di-n-propil* (negattiv falz tal-VRM) huma magħrufa li mhumiex irritanti fil-bnedmin (31) (32) (33), għalkemm huma identifikati bhala irritanti fit-test fuq il-fenek. Minhabba li l-mudelli tal-RhE huma bbażati fuq ċelloli ta' orġini mill-bniedem, jistgħu jbaṣṣru dawn is-sustanzi kimiċi bhala mhux irritanti (Ebda Kategorija tal-UN GHS/EU CLP).

Tabella 2.

Valuri ta' tbassir mehtieġa għas-sensittività, l-ispeċifità u l-preċiżjoni ġenerali għal kull metodu simili jew immodifikat sabiex jiġi kkunsidrat validu.

Sensittività	Speċifità	Preċiżjoni Ġenerali
$\geq 80 \%$	$\geq 70 \%$	$\geq 75 \%$

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tal-Istudju

13. Huwa possibbli li test wiehed jew aktar fuq sustanza kimika wahda jew aktar ma jissodisfax/jissodisfawx il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test għat-test u għas-sustanzi kimiċi ta' kontroll jew ma jkunx/jkunux aċċettabbli għal raġunijiet oħrajn. Biex dejta nieqsa tiġi kkumplementata, għal kull sustanza kimika ta' test huwa ammissibbli għadd massimu ta' żewġ testijiet oħrajn ("ittestjar mill-ġdid"). B'mod aktar preċiż, minhabba li fil-każ tal-ittestjar mill-ġdid il-PC u l-NC ukoll għandhom ikunu ttestjati fl-istess hin, jista' jsir għadd massimu ta' żewġ sensiliet ta' testijiet oħra għal kull sustanza kimika tat-test.
14. Huwa konċepibbli li anki wara l-ittestjar mill-ġdid, l-għadd minimu ta' tliet sensiliet ta' testijiet validi mehtieġa għal kull sustanza kimika ttestjata ma jinkisibx għal kull Sustanza Kimika ta' Referenza f'kull laboratorju partecipant, li jwassal għal matrici tad-dejta mhux kompluta. F'dawn il-każijiet it-tliet kriterji li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati kollha sabiex il-gabriet tad-dejta jitqiesu aċċettabbli:

1. Kull wahda mill-20 Sustanza Kimika ta' Referenza għandu jkollha mill-inqas sekwenza wahda shiha ta' sensiela ta' testijiet.

▼M3

2. F'kull wiehed minn mill-inqas tliet laboratorji partecipanti, minimu ta' 85 % tas-sekwenzi tas-sensiliet ta' testijiet għandhom ikunu shah (għal 20 sustanza kimika, jiġifieri 3 sekwenzi ta' sensiela ta' testijiet invalidi huma permessi f'laboratorju wiehed).
3. Minimu ta' 90 % tas-sekwenzi kollha ta' sensiliet ta' testijiet minn mill-inqas tliet laboratorji għandhom ikunu shah (għal 20 sustanza kimika ttestjati fi tliet laboratorji; jiġifieri sitt sekwenzi ta' sensiela ta' testijiet invalidi huma permessi b'kollox).

▼ M7

B.47. METODU TAT-TEST TAL-OPAĊITÀ U L-PERMEABILITÀ TAL-KORNEA FIL-BOVINI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' I) SUSTANZI KIMIĊI LI JINDUĊU HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIĊI LI MA JEHTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GHAL IRRITAZZJONI TAL-GHAJNEJN JEW HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 437 tal-OECD (2013). Il-metodu tat-test tal-Opaċità u l-Permeabilità tal-Kornea fil-Bovini ġie evalwat mill-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interagenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM), flimkien maċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Gappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM), fl-2006 u l-2010 (1)(2). Fl-ewwel evalwazzjoni, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ġie evalwat għall-utilità tiegħu sabiex jidentifika sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn (1). Fit-tieni evalwazzjoni, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ġie evalwat għall-utilità tiegħu sabiex jidentifika sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) mhux klassifikati għal irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn (2). Id-database tal-validazzjoni tal-BCOP kien fiha 113-il sustanza u 100 tahlita b'kolloxx (2)(3). Minn dawn l-evalwazzjonijiet u r-reviżjoni bejn il-pari tagħhom, ġie konkluż li l-metodu ta' ttestjar jista' jidentifika kif suppost sustanzi kimiċi (kemm sustanzi kif ukoll tahlitiet) li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn (Kategorija 1) kif ukoll dawk li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) (4) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Tahlitiet (CLP) ⁽¹⁾ u, għaldaqstant, ġie approvat bħala xjentifikament validu għal dawn iż-żewġ skopijiet. Hsara serja lill-ghajnejn hija l-produzzjoni ta' tibdiliet fl-ghajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wiċċ quddiem tal-ghajn, li ma jkunux reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn huma klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU. Is-sustanzi kimiċi mhux ikklassifikati għal irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn huma definiti bħala dawk li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU, jiġifieri huma msejhin bħala Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU. Dan il-metodu ta' ttestjar jinkludi l-użu rakkomandat u l-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP fuq il-bażi tal-evalwazzjonijiet tiegħu. Id-differenzi ewlenin bejn il-verżjoni originali tal-2009 u l-verżjoni aġġornata tal-2013 tal-linja gwida tat-test tal-OECD jikkoncernaw, iżda mhumiex limitati għal: l-użu tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni skont il-GHS tan-NU (paragrafi 2 u 7); kjarifiki fuq l-applikabilità tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għall-ittestjar ta' alkoħols, ketoni u solidi (paragrafi 6 u 7) u ta' sustanzi u tahlitiet (paragrafu 8); kjarifiki fuq kif għandhom jiġu testjati sustanzi tensjoattivi u tahlitiet li fihom tensjoattivi (paragrafu 28); aġġornamenti u kjarifiki dwar il-kontrolli pożittivi (paragrafi 39 u 40); aġġornament tal-kriterji dwar id-deċiżjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP (paragrafu 47); aġġornament tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju (paragrafu 48); aġġornament fl-elementi tar-rapport tat-test (paragrafu 49); aġġornament tal-Appendiċi 1 dwar id-definizzjonijiet; iż-żieda tal-Appendiċi 2 tal-kapaċità ta' previzjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP skont id-diversi sistemi ta' klassifikazzjoni; aġġornament tal-Appendiċi 3 fuq il-lista ta' sustanzi kimiċi tal-proficjenza; u aġġornament tal-Appendiċi 4 dwar l-apparat fejn titqiegħed il-kornea tal-BCOP (paragrafu 1) u dwar l-opaċitometru (paragrafi 2 u 3).

⁽¹⁾ Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-tahlitiet, 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

▼ M7

Ġeneralment huwa aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test *in vitro* tal-irritazzjoni tal-ghajnejn waħdu ma huwa sejjer ikun kapaċi jiehu post it-test Draize *in vivo* tal-ghajnejn sabiex ibassar il-medda shiha ta' irritazzjonijiet għal klassijiet ta' sustanzi kimiċi differenti. Madankollu, tahlitiet strateġiċi ta' diversi metodi ta' ttestjar alternattivi fi hdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu kapaċi jieħdu post it-test Draize tal-ghajnejn (5). L-approċċ minn Fuq għal Isfel (5) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija li jkollha potenzjal għoli ta' irritazzjoni, filwaqt li l-approċċ minn Isfel għal Fuq (5) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika ma tkunx mistennija tikkaġuna bizzejjed irritazzjoni tal-ghajnejn sabiex tkun teħtieġ li tiġi kklassifikata. Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti ċirkustanzi u fi hdan limitazzjonijiet speċifiċi għall-klassifikazzjoni tal-periklu għall-ghajnejn u t-tikkettar ta' sustanzi kimiċi. Filwaqt li ma jitqiesx li huwa validu bħala sostitut awtonomu għat-test *in vivo* tal-ghajnejn fuq il-fniek, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa rakkomandat bħala pass inizjali fi hdan strateġija ta' ttestjar, bħall-approċċ minn Fuq għal Isfel issuġġerit minn Scott *et al.* (5) sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, mingħajr ma jsiru iktar testijiet (4). Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa rakkomandat ukoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jeħtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, kif definiti mill-GHS tan-NU (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) (4) fi hdan strateġija ta' ttestjar bħall-approċċ minn Isfel għal Fuq (5). Madankollu, sustanza kimika li mhijiex prevista li tikkaġuna hsara serja lill-ghajnejn jew bħala mhux klassifikata għal irritazzjoni tal-ghajnejn/hsara serja lill-ghajnejn bil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP tkun teħtieġ iktar testijiet (*in vitro* u/jew *in vivo*) sabiex tistabbilixxi klassifikazzjoni definitiva.

L-għan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-ghajnejn kif imkejjel mill-hila tagħha li tinduċi opacità jew zieda fil-permeabilità f'kornea bovina izolata. L-effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu bi: (i) trażmissjoni mnaqqsa tad-dawl (opacità), u (ii) zieda fil-passaġġ tal-kulurant fluworexxein tas-sodju (permeabilità). Il-valutazzjonijiet tal-opacità u l-permeabilità tal-kornea wara esponiment għas-sustanza kimika tat-test jingħaqdu għall-kisba ta' Punteġġ tal-Irritazzjoni *In Vitro* (IVIS), li jintuża sabiex jiġi kklassifikat il-livell ta' irritazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP tal-ICCVAM (6)(7), li originarjament kien żviluppat minn informazzjoni miksuba mill-Istitut għall-protokoll tax-Xjenzi *in vitro* (IIVS) u l-Protokoll 124 tal-INVITTOX (8). Dan tal-aħħar jirrappreżenta l-protokoll użat għall-istudju ta' prevalidazzjoni sponsorjat mill-Komunità Ewropea li sar fl-1997-1998. Dawn iż-żewġ protokollu kienu bbażati fuq il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP irrapportat għall-ewwel darba minn Gautheron *et al.* (9).

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn kif definiti mill-GHS tan-NU, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati taħt il-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU (4). Meta jintuża għal dan il-għan, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 79 % (150/191), rata ta' foloz pożittivi ta' 25 % (32/126), rata ta' foloz negattivi ta' 14 % (9/65), meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* tal-ghajnejn tal-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (3) (ara l-Appendiċi 2, Tabella 1). Meta s-sustanzi kimiċi tat-test fi hdan ċerti klassijiet ta' sustanzi kimiċi (jiġifieri alkohols, ketoni) jew fiżiċi (jiġifieri solidi) jiġu esklużi mid-database, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 85 % (111/131), rata ta' foloz pożittivi ta' 20 % (16/81), rata ta' foloz negattivi ta' 8 % (4/50) għas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (3). In-nuqqasijiet potenzjali tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP meta jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn (Kategorija 1

▼ M7

tal-GHS tan-NU) huma bbażati fuq ir-rati għoljin ta' foloz pożittivi għal alcohols u ketoni u r-rata għolja ta' foloz negattivi għal solidi osservati fid-database dwar il-validazzjoni (1)(2)(3). Madankollu, peress li mhux l-alcohols u l-ketoni kollha huma mbassra b'mod eċċessiv mill-metodu ta' ttestjar tal-BCOP u whud huma mbassrin kif suppost bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, dawn iż-żewġ gruppi funzjonali organiċi ma jittqisux li jaqgħu barra mid-dominju ta' applikabilità tal-metodu ta' ttestjar. Huwa f'idejn l-utent ta' dan il-metodu ta' ttestjar li jiddeċiedi jekk previzjoni eċċessiva possibbli ta' alcohols jew keton tistax tiġi aċċettata jew jekk għandhomx isiru iktar testijiet f'approċċ tal-piż tal-evidenza. Rigward ir-rati ta' foloz negattivi għas-solidi, ta' min jinnota li s-solidi jistgħu jwasslu għal kundizzjonijiet varjabbli u ta' esponiment estrem fit-test Draize *in vivo* tal-irritazzjoni tal-ghajnejn, li jitsgħu jirriżultaw fi previzjonijiet irrilevanti tal-potenzjal ta' irritazzjoni veru tagħhom (10). Ta' min jinnota wkoll li l-ebda wiehed mill-foloz negattivi identifikati fid-database tal-validazzjoni tal-ICCVAM (2)(3), fil-kuntest ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU), ma rriżulta f' $IVIS \leq 3$, li huwa l-kriterju użat sabiex sustanza kimika tat-test tiġi identifikata bħala Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU. Barra minn hekk, f'dan il-kuntest il-foloz negattivi tal-BCOP mhumix kritiċi peress li s-sustanzi kimiċi kollha tat-test li jipproduċu $3 < IVIS \leq 55$ imbagħad jiġu ttestjati b'testijiet *in vitro* validati adegwatament oħrajn, jew bħala l-aħħar alternattiva fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strategija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piż tal-evidenza. Peress li ċerti sustanzi kimiċi solidi huma previsti kif suppost mill-metodu ta' ttestjar tal-BCOP bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, dan l-istat fiżiku lanqas ma jttqies li ma jaqax taht id-dominju tal-applikabilità tal-metodu ta' ttestjar. L-investigaturi għandhom jikkunsidraw jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, f'liema każ $IVIS > 55$ għandu jiġi aċċettata bħala indikatur ta' rispons inklużu hsara serja lill-ghajnejn li għandu jiġi klassifikat bħala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU mingħajr ma jsiru iktar testijiet. Madankollu, kif diġà ntqal, riżultati pożittivi miksuba bl-alcohols jew il-ketoni għandhom jiġu interpretati b'ċerta kawtela minhabba potenzjal ta' tbassir żejjed.

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4). Meta jintuża għal dan il-ghan, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 69 % (135/196), rata ta' foloz pożittivi ta' 69 % (61/89), rata ta' foloz negattivi ta' 0 % (0/107), meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* tal-ghajnejn tal-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (3) (ara l-Appendiċi 2, Tabella 2). Ir-rata ta' foloz pożittivi miksuba (sustanzi kimiċi ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU li *in vivo* jipproduċi $IVIS > 3$, ara l-paragrafu 47) hija konsiderevolment għolja, iżda mhijiex kritika f'dan il-kuntest peress li s-sustanzi kimiċi kollha tat-test li jipproduċu $3 < IVIS \leq 55$ imbagħad jiġu ttestjati b'testijiet *in vitro* validati adegwatament oħrajn, jew bħala l-aħħar alternattiva fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strategija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piż tal-evidenza. Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma juri ebda nuqqas speċifiku għall-ittestjar ta' alcohols, ketoni u solidi meta l-iskop ikun li jiġu identifikati sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) (3). L-investigaturi għandhom jikkunsidraw jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, f'liema każ riżultat negattiv ($IVIS \leq 3$) għandu jiġi aċċettata bħala indikatur li ma hemm bżonn ta' ebda klassifikazzjoni (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU). Peress li l-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jidentifika korrettament 31 % biss mis-sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, dan il-metodu ta' ttestjar ma għandux ikun l-ewwel għażla sabiex jinbeda approċċ minn Isfel għal Fuq (5), jekk ikun hemm metodi *in vitro* validati u aċċettati oħrajn b'sensittività għolja simili iżda speċifità għolja għad-dispożizzjoni.

▼ M7

Id-database tal-validazzjoni tal-BCOP kien fiha 113-il sustanza u 100 tahlita b'kollox (2)(3). Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jitqies applikabbli għall-itestjar taż-żewġ sustanzi u tahlitiet.

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP mhuwiex rakkomandat għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala irritanti għall-ghajnejn (Kategorija 2 jew Kategorija 2A tal-GHS tan-NU) jew sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala ftit irritanti għall-ghajnejn (Kategorija 2B tal-GHS tan-NU) minhabba n-numru konsiderevoli ta' sustanzi kimiċi tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU bħala sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU u ta' Edda Kategorija tal-GHS tan-NU sovraklassifikati bħala Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU(2)(3). Għal dan il-ghan, jista' jkun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet b'metodu xieraq iehor.

Il-proċeduri kollha li jinvolvu għajnejn bovini u korneji bovini għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-istallazzjoni tal-itestjar f'dak li għandu x'jaqşam mal-manipulazzjoni ta' materjali dderivati mill-annimali, li jinkludu, iżda li mhumiex limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Huwa rakkomandat li jittiehdu l-prekawzjonijiet universali tal-laboratorju (11).

Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma jqisx feriti konġuntivali u iridali, jindirizza l-effetti korneali, li huma kawża primarja tal-klassifikazzjoni *in vivo* meta titqies il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU. Ir-reversibilità tal-feriti korneali ma tistax tiġi evalwata *per se* fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP. Gie propost, abbazi ta' studji fuq għajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali tal-ferita fil-kornea tista' tintuża sabiex jiġu identifikati xi tipi ta' effetti riversibbli (12). Madankollu, hemm bżonn ta' iktar għarfien xjentifiku sabiex nifhmu kif isehhu effetti irreversibbli mhux marbtin ma' ferita inizjali ta' livell għoli. Fl-aħħar nett, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma jippermettix li ssir valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment okulari.

Dan il-metodu ta' ttestjar sejjegħi aġġornat kull ċertu żmien iktar ma jkun hemm informazzjoni u dejta godda kkunsidrati. Pereżempju, l-istopatoloġija tista' tkun potenzjalment siewja meta jkun hemm bżonn ta' karatterizzazzjoni iktar kompluta tal-hsara fil-kornea. Ki spjegat fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 160 (13), daww li jużaw huma mheggin jippreservaw il-kornei u jhejju kampjuni għall-istopatoloġija li jistgħu jintużaw sabiex jiġu żviluppati database u kriterji dwar id-deċiżjonijiet li jistgħu jkomplu jtejb u l-preċiżjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment jistabbilixxi dan il-metodu ta' ttestjar, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi tal-profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 3. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi sabiex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP qabel ma jissottometti dejta tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa mudell organotipiku li jipprovdi manutenzjoni fuq perjodu qasir tal-funzjoni fiżjoloġika u bijokimika normali tal-kornea tal-bovini *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-hsara mis-sustanza kimika tat-test tiġi vvalutata minn kejl kwantitattiv ta' bidliet fl-opaċità u l-permeabilità tal-kornea permezz ta' opaċitometru u spettrofotometru ta' daww viżibbli, rispettivament. Iż-żewġ tipi ta' kejl jintużaw sabiex jiġi kkalkolat IVIS, li jintuża sabiex tiġi assenjata kategorija ta' klassifikazzjoni tal-periklu ta' irritazzjoni *in vitro* għat-tbassir tal-potenzjal ta' irritazzjoni okulari tas-sustanza kimika tat-test *in vivo* (ara l-Kriterji tad-Deċiżjoni fil-paragrafu 48).

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP juża kornei izolati mill-ghajnejn ta' bhejjem li jkunu għadhom kemm inqatlu. L-opaċità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' trażmissjoni ta' daww minn ġol-kornea. Il-permeabilità titkejjel b'mod kwantitattiv bħala l-ammont ta' zebgħa fluworexxeina tas-sodju li jgħaddi

▼ M7

min-naħa għall-oħra tal-hxuna kollha tal-kornea, kif individwat fil-medium fil-kavità posterjuri. Is-sustanzi kimiċi tat-test, li jiġu introdotti fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, jiġu applikati fis-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. L-Appendiċi 4 tipprovdi deskrizzjoni u dijagramma tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea użat fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP. L-apparat fejn titqiegħed il-kornea jista' jinx tara minn sorsi differenti jew jista' jinbena.

Is-Sors u l-Età tal-Għajnejn tal-Bovini u l-Għażla tal-Ispicijiet tal-Annimali

Bhejjem mibgħuta l-biċċeriji tipikament jinqatlu jew għall-konsum mill-bniedem jew inkella għal użi kummerċjali oħrajn. Bħala sors ta' korneji għall-użu fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jintużaw biss l-annimali b'saħħithom li jitqiesu xierqa sabiex jidhlu fil-katina alimentari tal-bniedem. Minhabba li l-bhejjem għandhom skala wiesgħa ta' piżijiet, skont ir-razza, l-età u s-sess, mhemmx piż irrakkomandat għall-annimal meta jiġi biex jinqatel.

Meta jintużaw għajnejn minn annimali ta' età differenti jistgħu jirriżultaw varjazzjonijiet fid-dimensjonijiet tal-kornea. Korneji b'dijametru orizzontali > 30.5 mm u valuri tal-hxuna ċentrali tal-kornea (CCT) ≥ 1100 μm ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom aktar minn tmien snin, filwaqt li daww b'dijametru orizzontali < 28.5 mm u CCT < 900 μm ġeneralment jinkisbu minn bhejjem li jkollhom anqas minn hames snin (14). Minhabba f'hekk, tipikament ma jintużawx għajnejn minn bhejjem li jkollhom aktar minn 60 xahar. Għajnejn minn bhejjem li jkollhom anqas minn 12-il xahar tradizzjonalment ma ntuzawx għaliex l-għajnejn ikunu għadhom qegħdin jiżviluppaw u l-hxuna tal-kornea u d-dijametru tal-kornea jkunu iżgħar b'mod konsiderevoli minn daww irrapportati għall-għajnejn mill-bhejjem adulti. Madankollu, l-użu ta' kornei minn annimali żgħar (jiġifieri ta' età minn 6 xhur sa 12-il xahar) huwa permess minhabba li hemm xi vantaġġi, bħal pereżempju disponibilità akbar, skala dejqa ta' etajiet, u inqas perikli marbuta ma' esponiment potenzjali tal-haddiema għall-Enċefalopatija Spongiforma Bovina (15). Minhabba li aktar evalwazzjoni tal-effett tad-daqs jew il-hxuna tal-kornea fuq is-sensibilità għal sustanzi kimiċi korrużivi u irritanti tkun utli, l-utenti huma mhegġin jirrapportaw stima tal-età u/jew il-piż tal-annimali li jipprovdu l-korneji użati fi studju.

Ġbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

L-għajnejn jingabru mill-impjegati tal-biċċerija. Sabiex jiġu minimizzati l-hsara mekkanika u tipi oħrajn ta' hsara lill-għajnejn, l-għajnejn għandhom jiġu enukleati mill-iktar fis wara l-mewt u jittkesshu minnufih wara l-enukleazzjoni u matul it-trasport. Sabiex jiġi evitat l-esponiment tal-għajnejn għal sustanzi kimiċi potenzjalment irritanti, il-haddiema tal-biċċerija ma għandhomx jużaw detergent meta jlahalhu ras l-annimal.

L-għajnejn għandhom jingħaddsu kompletament f'Soluzzjoni tal-Melħ Ekwilibrata mkessha ta' Hanks, (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) freċċipjent ta' daqs adattat, u ttrasportati lejn il-laboratorju b'mod li kemm jista' jkun inaqqas id-deterjorament u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. Minhabba li l-għajnejn jingabru waqt il-proċess tal-qatla, dawn jistgħu jiġu esposti għad-demem u għal materjali bijoloġiċi oħrajn, inklużi batterji u mikroorganizmi oħrajn. Għalhekk huwa importanti li jiġi żgurat li r-riskju ta' kontaminazzjoni jitnaqqas kemm jista' jkun (eż. billi r-reċipjent li jkun fih l-għajnejn jinżamm fuq silġ imxarrab, billi jizjeddu antibijotiċi fl-HBSS li tintuza għall-hżin tal-għajnejn waqt it-trasport [eż. 100 IU/mL ta' penicillina u 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ta' streptomicina]).

L-intervall tal-hin li jgħaddi minn meta jingabru l-għajnejn u l-użu tal-kornei fil-BCOP għandu jtnaqqas kemm jista' jkun (tipikament għandhom jingabru u jintużaw fl-istess ġurnata) u għandu jintwera li dan ma jikkompromettix ir-riżultati tal-assaġġ. Dawn ir-riżultati huma bbażati fuq il-kriterji tal-għażla għall-għajnejn, kif ukoll ir-risponsi tal-kontrolli pożittivi u negattivi. L-għajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'ġurnata speċifika.

Il-Kriterji tal-Għażla għall-Għajnejn Użati fil-Metodu ta' Ttestjar tal-BCOP

Malli jaslu fil-laboratorju, l-għajnejn jiġu eżaminati bir-reqqa għad-difetti inklużi zieda fl-opacità, grif u neovaskularizzazzjoni. Għandhom jintużaw biss il-korneji minn għajnejn li ma jkollhom l-ebda difett ta' dan it-tip.

▼ **M7**

Il-kwalità ta' kull kornea tiġi evalwata wkoll fi stadji li jiġu aktar 'il quddiem fl-assaġġ. Korneji li għandhom opaċità ikbar minn seba' unitajiet tal-opaċità jew ekwivalenti għall-opaċitometru u apparati fejn titqiegħed il-kornea wara perjodu ta' ekwilibrazzjoni inizjali ta' siegħa għandhom jintremew (*NOTA*: l-opaċitometru għandu jiġi kkalibrat bi standards tal-opaċità li jintużaw sabiex jiġu stabbiliti l-unitajiet tal-opaċità, ara l-Appendiċi 4).

Kull grupp tat-trattament (sustanza kimika tat-test, kontrolli negattivi u pożittivi paralleli) jikkonsisti minn minimu ta' tliet għajnejn. Fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP għandhom jintużaw tliet korneji għall-kontroll negattiv. Minhabba li l-korneji kollha jinqatgħu barra mill-globu shih, u jitqiegħdu fil-kavitajiet tal-korneji, il-manipulazzjoni tagħhom tista' tirriżulta f'artefatti fil-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-korneji individwali (inkluż il-kontroll negattiv). Barra minn hekk, il-valuri tal-opaċità u l-permeabilità mill-korneji tal-kontroll negattiv jintużaw biex jikkoreġu l-valuri tal-opaċità u l-permeabilità tal-kornei ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u l-kornei ttrattati bil-kontroll pożittiv fil-kalkoli tal-IVIS.

PROCEDURA**Preparazzjoni tal-Għajnejn**

Korneji li ma jkollhom l-ebda difett jiġu dissezżjonati b'tali mod li jibqa' minn 2 sa 3 mm ta' xifer tal-isklerotika sabiex jgħin il-manipulazzjoni sussegwenti, u dan isir b'attenzjoni sabiex tiġi evitata kwalunkwe hsara fl-epitelju u l-endotelju. Korneji izolati jitqiegħdu f'apparat fejn titqiegħed il-kornea ddisinjat speċjalment għal dan il-ghan li jikkonsisti f'kavitajiet anterjuri u posterjuri, li jkunu f'kuntatt mal-ġenb epiteljali u l-ġenb endoteljali tal-kornea, rispettivament. Iz-żewġ kavitajiet jimtlew sax-xifer bil-Medium Essenzjali Minimu ta' Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) mingħajr fenol ahmar (l-ewwel il-kavità posterjuri), filwaqt li jiġi żgurat li ma jiffirmawx b'żieqa. L-apparat imbagħad jiġi kkalibrat għal tal-anqas siegħa f'temperatura ta' 32 ± 1 °C sabiex il-korneji jekwilibraw mal-medium u jiksibu kemm jista' jkun possibbli attivitá metabolika normali (it-temperatura approssimattiva tas-superfiċje tal-kornea *in vivo* hija 32 °C).

Wara l-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, EMEM frisk, mingħajr fenol ahmar u msahhan minn qabel jiżdied fiż-żewġ kavitajiet u jittiehed l-ewwel qari tal-valuri tal-opaċità għal kull kornea. Kwalunkwe kornea li turi hsara makroskopika fit-tessut (eż. grif, pigmentazzjoni, neovaskularizzazzjoni) jew opaċità ikbar minn seba' unitajiet tal-opaċità jew ekwivalenti għall-opaċitometru u l-apparat fejn titqiegħed il-kornea użati jintremew. Tal-inqas tliet korneji jintgħażlu bħala korneji tal-kontroll negattiv (jew solvent). Imbagħad, il-korneji li jifdal jiġu ddis-tribwiti fi grupp tat-trattament u tal-kontroll pożittiv.

Minhabba li l-kapaċità tas-shana tal-ilma hija oghla minn dik tal-arja, l-ilma jipprovdni kundizzjonijiet ta' temperatura aktar stabbli għall-inkubazzjoni. Għal-hekk, huwa rrakkomandat l-użu ta' banju tal-ilma sabiex l-apparat fejn titqiegħed il-kornea u l-kontenut tiegħu jinzammu f'temperatura ta' 32 ± 1 °C. Madankollu, jistgħu jintużaw ukoll inkubaturi tal-arja, filwaqt li jittiehdu prekawzjonijiet sabiex tinzamm l-istabilità tat-temperatura (eż., billi l-apparat u l-media jissahhnu minn qabel).

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Jintużaw żewġ protokoll ta' trattament, wieħed għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi (solidi jew likwidi), u iehor għal solidi li mhumix aġenti tensjoattivi.

Il-likwidi jiġu ttestjati meta ma jkunux dilwiti. Semisolidi, kremi u x-xema' tipikament jiġu ttestjati bħala likwidi. Sustanzi tensjoattivi puri jiġu ttestjati f'konċentrazzjoni ta' 10 % w/v f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0.9 %, ilma distillat, jew solvent iehor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xierqa għal

▼ M7

konċentrazzjonijiet ta' dilwizzjoni alternattivi. Tahlitiet li fihom aġenti tensjoattivi jistgħu jiġu ttestjati mhux dilwiti jew dilwiti f'konċentrazzjoni xierqa skont ix-xenarju tal-esponiment rilevanti *in vivo*. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xierqa għall-konċentrazzjoni ttestjata. Il-kornei jiġu esposti għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi għal 10 minuti. L-użu ta' hinijiet oħrajn ta' esponiment għandu jkun ibbażat fuq raġuni xjentifika xierqa. Jekk jogħġbok ara l-Appendiċi 1 għal definizzjoni ta' tahlita tensjoattiva u tahlita li fiha aġent tensjoattiv.

Solidi li mhumex aġenti tensjoattivi tipikament jiġu ttestjati bħala soluzzjonijiet jew sospensjonijiet f'konċentrazzjoni ta' 20 % w/v f'soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0.9 %, ilma distillat, jew solvent ieħor li jkun intwera li ma għandu l-ebda effetti avversi fuq is-sistema tat-test. F'ċerti ċirkostanzi u b'ġustifikazzjoni xjentifika xierqa, is-solidi jistgħu jiġu ttestjati puri b'applikazzjoni diretta fuq is-superfiċje tal-kornea permezz tal-metodu tal-kavità miftuħa (ara l-paragrafu 32). Il-korneji jiġu esposti għas-solidi għal erba' sigħat, izda bħalma jsir għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi, jistgħu jintużaw hinijiet ta' esponiment alternattivi fuq il-bażi ta' raġuni xjentifika xierqa.

Jistgħu jintużaw metodi ta' trattament differenti, skont in-natura fiżika u l-karatteristiċi kimiċi (eż. solidi, likwidi, likwidi viskużi jew mhux viskużi) tas-sustanza kimika tat-test. Il-fattur kritiku huwa li jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test tkopri b'mod xieraq is-superfiċje tal-epitelju u li titneħħa b'mod xieraq waqt l-istadji tat-tlahli. Metodu tal-kavità magħluqa tipikament jintuża għal sustanz kimiċi tat-test li jvarjaw minn likwidi mhux viskużi għal likwidi viskużi ftit, filwaqt li metodu tal-kavità miftuħa tipikament jintuża għal sustanzi tat-test li jvarjaw minn likwidi semiviskużi għal likwidi viskużi u għal solidi puri.

Fil-metodu tal-kavità magħluqa, ammont tas-sustanza kimika tat-test (750 µl) li jkun biżżejjed biex ikopri l-kavità anterjuri jiġi introdott minn ġot-toqob tad-dożaġġ fuq is-superfiċje ta' fuq tal-kavità, u t-toqob sussegwentement jiġu ssiġillati bit-tappieri tal-kavità waqt l-esponiment. Huwa importanti li jiġi żgurat li kull kornea tiġi esposta għas-sustanza kimika tat-test għall-intervall tal-hin xieraq.

Fil-metodu tal-kavità miftuħa, iċ-ċirku li jsakkar it-tieqa u t-tieqa tal-ħġieg jitneħħew mill-kavità anterjuri qabel ma jibda t-trattament. Il-kontroll jew is-sustanza kimika tat-test (750 µl, jew biżżejjed sustanza kimika tat-test biex tiksi l-kornea għalkollox) jiġu applikati direttament fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea permezz ta' mikropipetta. Jekk ikun diffiċli li tuża l-pipetta għas-sustanza kimika tat-test, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi kkargata bil-pressa f'pipetta bi spostament pożittiv sabiex tghin fid-dożaġġ. Il-ponta tal-pipetta bi spostament pożittiv, tiddaħhal fil-ponta tad-distribuzzjoni tas-siringa sabiex il-materjal ikun jista' jingibed fil-ponta tal-pipetta taħt pressjoni. Imbagħad jeħtieġ li l-pistun tal-pipetta jingibed 'il fuq fl-istess waqt li l-pistun tas-siringa jingħafas 'l isfel. Jekk fil-ponta tal-pipetta jiffurmaw xi bzieżaq tal-arja, is-sustanza kimika tat-test għandha titneħħa (tinħareġ 'il barra) u l-proċess jiġi ripetut sa mal-ponta timtela mingħajr ma jkun hemm bzieżaq tal-arja. Jekk ikun meħtieġ, tista' tintuża siringa normali (mingħajr labra) minhabba li din tippermetti l-kejl ta' volum akkurat tas-sustanza kimika tat-test u applikazzjoni eħfef fuq is-superfiċje tal-epitelju tal-kornea. Wara d-dożaġġ, it-tieqa tal-ħġieg terġa' titqiegħed fuq il-kavità anterjuri biex terġa' tinholq sistema magħluqa.

Inkubazzjoni ta' Wara l-Esponiment

Wara l-perjodu ta' esponiment, is-sustanza kimika tat-test, is-sustanza kimika tal-kontroll negattiv, jew tal-kontroll pożittiv jitneħħew mill-kavità anterjuri u l-epitelju jinhaslu tal-inqas tliet darbjet (jew sakemm ma tkun tista' tiġi osservata l-ebda evidenza viziva tas-sustanza kimika tat-test) bl-EMEM (li jkun fih il-fenol aħmar). Medium li jkun fih il-fenol aħmar jintuża għat-tlahli minhabba li bidla fil-kulur tal-fenol aħmar tista' tiġi mmonitorjata sabiex tiġi ddeterminata l-effikaċja tat-tlahli ta' sustanzi kimiċi tat-test aċidużi jew alkalini. Il-korneji jinhaslu aktar minn tliet darbjet jekk il-fenol aħmar jibqa' jibdel il-kulur (isfar jew vjola),

▼ **M7**

jew is-sustanza kimika tat-test tkun għadha vizibbli. Ladarba l-medium ma jibqaghlux sustanza kimika tat-test, il-kornei jitlallu għall-aħħar darba bl-EMEM (mingħajr fenol aħmar). L-EMEM (mingħajr fenol aħmar) jintuża għall-aħħar tlietliha sabiex jiġi żgurat li l-fenol aħmar jitneħħa kompletament mill-kavità anterjuri qabel ma titkejjel l-opacità. Imbagħad il-kavità anterjuri terġa' timtela b'EMEM frisk mingħajr fenol aħmar.

Għal-likwidi jew l-aġenti tensjoattivi, wara t-tlietliha, il-kornei jiġu inkubati għal sagħtejn oħra f'temperatura ta' 32 ± 1 °C. F'certi ċirkostanzi hin itwal ta' inkubazzjoni wara l-esponiment jista' jkun utli u jista' jiġi kkunsidrati fuq bażi ta' każ b'każ. Kornei ttrattati b'solidi jitlallu kompletament fi tmiem il-perjodu tal-esponiment li jidm erba' sigħat, iżda ma jehtigux aktar inkubazzjoni.

Fi tmiem il-perjodu ta' inkubazzjoni wara l-esponiment għal-likwidi u l-aġenti tensjoattivi u fi tmiem il-perjodu tal-esponiment ta' erba' sigħat għas-solidi li mhumex aġenti tensjoattivi, jiġu rreġistrati l-opacità u l-permeabilità ta' kull kornea. Barra minn hekk, kull kornea tiġi osservata b'mod viżiv u l-osservazzjonijiet pertinenti jiġu rreġistrati (eż. tqaxxir tat-tessuti, sustanza kimika tat-test residwa, opacità mhux uniformi). Dawn l-osservazzjonijiet jistgħu jkunu importanti għalhekk jistgħu jiġu riflessi minn varjazzjonijiet fil-qari tal-valuri tal-opacitometru.

Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

Kontrolli negattivi jew tas-solvent/tal-veikolu u kontrolli pozzittivi paralleli jiġu inkluzi f'kull esperiment.

Meta sustanza likwida tiġi ttestjata f'100 %, kontroll negattiv (eż., soluzzjoni tal-klorur tas-sodju ta' 0.9 % jew ilma distillat) jiġi inkluz fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP sabiex ikunu jistgħu jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti ta' tmiem tal-assaġġ. Dan jiżgura wkoll li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx b'mod li mhux xieraq f'rispons irritanti.

Meta jiġi ttestjat likwidi dilwit, aġent tensjoattiv jew solidu fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP, jiġi inkluz grupp tal-kontroll tas-solvent/tal-veikolu parallel sabiex ikunu jistgħu jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test u sabiex tiġi pprovduta linja ta' bażi għall-punti ta' tmiem tal-assaġġ. Jista' jintuża biss solvent/veikolu li jkun intwera li ma għandu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.

Sustanza kimika magħrufa li tinduċi rispons pozzittiv hija inkluz bħala kontroll pozzittiv parallel f'kull esperiment sabiex tiġi verifikata l-integrità tas-sistema tat-test u t-twettiq korrett ta' dan. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pozzittiv tista' tiġi vvalutata, id-daqs tar-reazzjoni irritanti ma għandux ikun eċċessiv.

Eżempji ta' kontrolli pozzittivi għal sustanzi kimiċi tat-test likwidi huma 100 % etanol jew 100 % dimetilformamid. Eżempju ta' kontroll pozzittiv għal sustanzi kimiċi tat-test huwa 20 % w/v imidazol f'0.9 % soluzzjoni tal-klorur tas-sodju.

Is-sustanzi kimiċi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanzi kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew tal-prodotti jikkawżaw irritazzjoni okulari, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-għajnejn tikkawża irritazzjoni okulari fi hdan skala speċifika ta' risponsi ta' sustanzi irritanti.

Punti ta' Tmiem Imkejlin

L-opacità tiġi stabbilita mill-ammont ta' trażmissjoni ta' dawl minn ġol-kornea. L-opacità tal-kornea titkejjel b'mod kwantitattiv permezz ta' opacitometru, li jagħti valuri ta' opacità fuq skala kontinwa.

Il-permeabilità tiġi stabbilita mill-ammont taż-żebugħa fluworexxeina tas-sodju li tippenetra s-saffi kollha taċ-ċelloli tal-kornea (jiġifieri l-epitelju fuq is-superfície esterna tal-kornea għal ġol-endotelju fuq is-superfície interna tal-kornea). Millilitru ta' soluzzjoni ta' fluworexxeina tas-sodju (4 jew 5 mg/ml meta jiġu ttestjati likwidi jew aġenti tensjoattivi jew solidi li mhumex aġenti tensjoattivi, rispettivamente) jiżdied fil-kavità anterjuri tal-apparat fejn titqiegħed il-kornea, li tkun f'kontatt mal-ġenb epiteljali tal-kornea, filwaqt li l-kavità posterjuri, li tkun f'kontatt mal-ġenb endoteljali tal-kornea, timtela b'EMEM frisk. Imbagħad l-apparat jiġi inkubat f'pożizzjoni orizzontali għal 90 ± 5 min fi 32 ± 1 °C. L-ammont ta'

▼ **M7**

fluworexxeina tas-sodju li jgħaddi għal ġol-kavità posterjuri jitkejjel b'mod kwan-tittattiv permezz ta' spettrofotometru UV/VIS. Kejl spettrofotometriku evalwat f'490 nm jiġi rreġistrat bħala densità ottika (OD490) jew valuri ta' assorbiment li jitkejlu fuq skala kontinwa. Il-valuri ta' permeabilità tal-fluworexxeina jiġu stabbiliti bl-użu ta' valuri ta' OD490 fuq il-bażi ta' spettrofotometru vizibbli li juża traġitt ottiku standard ta' 1 cm.

Inkella jista' jintuża qarrej tal-folja tal-mikrotitrazzjoni b'96 bwejra diment li; (i) tkun tista' tiġi stabbilita l-iskala ta' valuri lineari tal-qarrej tal-folja għad-determinazzjoni tal-valuri tal-fluworexxeina OD490; u (ii), jintuża l-volum it-tajjeb ta' kampjuni ta' fluworexxeina fil-folja b'96 bir sabiex jinkisbu valuri OD490 ekwivalenti għat-traġitt okulari standard ta' 1 cm (dan jista' jkun jehtieg bir shih [normalment 360µl]).

DEJTA U RAPPORTAR**Evalwazzjoni tad-Dejta**

Ladarba l-valuri (OD490) tal-opacità u l-permeabilità medja jkunu ġew ikkoreġuti għall-opacità tal-isfond u l-valuri OD490 tal-permeabilità tal-kontroll negattiv, il-valuri medji OD490 tal-opacità u l-permeabilità għal kull grupp ta' trattament għandhom jiġu kkombinati f'formula dderivata empirikament sabiex jiġi kkalkulat punteġġ tal-irritanza *in vitro* (IVIS) għal kull grupp tat-trattament kif ġej:

$$\text{IVIS} = \text{valur medju tal-opacità} + (15 \times \text{valur OD490 medju tal-permeabilità})$$

Sina *et al.* (16) irrapportaw li din il-formula giet idderivata matul studji interni u bejn laboratorji. Id-dejta ġġenerata għal sensiela ta' 36 kompost fi studju fost bosta laboratorji giet soġġetta għal analiżi b'varjabbli mutlipli sabiex tiġi ddeterminata l-ekwazzjoni tal-aqwa adattament bejn id-dejta *in vivo* u dik *in vitro*. Ix-xjentisti f'zewġ kumpaniji separati għamlu din l-analiżi u waslu għal ekwazzjonijiet kważi identiċi.

Il-valuri tal-opacità u tal-permeabilità għandhom jiġu evalwati wkoll b'mod indipendenti sabiex jiġi ddeterminat jekk sustanza kimika tat-test tkunx ipprovokat korrużività jew irritazzjoni severa permezz ta' wiehed biss miż-żewġ punti ta' tmiem (ara l-Kriterji tad-Deciżjoni).

Kriterji tad-Deciżjoni

Il-valuri limitu tal-IVIS għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu ħsara serja lill-ghajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU) u sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ghajnejn jew ħsara serja lill-ghajnejn (Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) jingħataw hawnhekk:

IVIS	GHS tan-NU
≤ 3	Ebda Kategorija
> 3; ≤ 55	Ma tista' ssir ebda previżjoni
> 55	Kategorija 1

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tal-Istudju

Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontroll pożittiv jagħti IVIS li jkun fi hdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika attwali, li tiġi aġġornata tal-anqas kull tliet xhur, jew kull darba li jitwettagħ test aċċettabbli f'laboratorji fejn it-testijiet ma jitwettqux b'mod frekwenti (jiġifieri anqas minn darba fix-xahar). Ir-reazzjonijiet mill-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-medium għandhom jirriżultaw f'valuri ta' opacità u permeabilità li jkunu anqas mill-ogħla limiti stabbiliti għall-valuri tal-opacità u l-permeabilità tal-isfond għall-korneji bovini ttrattati bil-kontroll negattiv jew tas-solvent/tal-veikolu rispettiv. Sessjoni waħda ta' ttestjar

▼ **M7**

magħmula minn tal-inqas tliet korneji għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta l-klassifikazzjoni li tirriżulta tkun inekwivokabbli. Madankollu, f'każijiet ta' riżultati mhux ċari fl-ewwel sensiela ta' testijiet, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sensiela ta' testijiet (iżda mhux bilfors), kif ukoll it-tielet wahda fil-każ ta' riżultati tal-IVIS medju li ma jaqblux bejn l-ewwel żewġ sensieli ta' testijiet. F'dan il-kuntest, riżultat fl-ewwel sensiela ta' testijiet jitqies li mhuwiex ċar jekk il-previżjonijiet mit-3 korneji ma jkunux jaqblu, b'tali mod li:

- 2 mit-3 korneji taw previżjonijiet li ma jaqblux mill-medja tat-3 korneji kollha kemm huma, JEW,
- 1 mit-3 korneji tat previżjoni li ma taqbilx mill-medja tat-3 korneji kollha kemm huma, U r-riżultat li ma jaqbiżx kien > 10 unitajiet tal-IVIS mil-limitu ta' 55.
- Jekk is-sensiela ripetuta ta' testijiet tikkonferma l-previżjoni tal-ewwel sensiela ta' testijiet (fuq il-bażi tal-valur medju tal-IVIS), tkun tista' tittiehed deċiżjoni finali mingħajr ma jsiru testijiet oħrajn. Jekk is-sensiela ripetuta ta' testijiet fi previżjoni mhux konkordanti mill-ewwel sensiela ta' testijiet (fuq il-bażi tal-valur medju tal-IVIS), issir it-tielet u l-aħħar sensiela ta' testijiet sabiex jiġu solvuti l-previżjonijiet li ma jaqblux, u sabiex tiġi kklassifikata s-sustanza kimika tat-test. Jista' jkun awtorizzat li jiġu rinunzjati iktar testijiet għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar f'każ li xi sensiela ta' testijiet tirriżulta fi previżjoni tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun rilevanti għat-tweġġ tal-istudju:

Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

- Isem tas-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) pereżempju l-isem strutturali użat mill-Chemical Abstracts Service (CAS), segwit minn ismijiet oħrajn, jekk ikunu magħrufin; in-Numru tar-Reġistru (RN) tas-CAS, jekk ikun magħruf;
- Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza kimika tat-test/tal-kontroll (f'perċentwal(i) skont il-piż), sakemm din l-informazzjoni tkun disponibbli;
- Proprietajiet fizikokimiċi bħall-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-tweġġ tal-istudju;
- Trattament tas-sustanzi kimiċi tat-test/ta' kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- L-istabilità, jekk tkun magħrufa.

Informazzjoni dwar l-Ispenser u l-Faċilità tat-Test

- L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju.

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

- L-opacitometru użat (eż. mudell u speċifikazzjonijiet) u l-issettjar tal-istrumenti;
- L-informazzjoni dwar il-kalibragg għal apparati użati għall-kejl tal-opacità u l-permeabilità (eż. opacitometru u spettrofotometru) sabiex tiġi żgurata linearità tal-kejl;
- It-tip ta' apparati fejn titqiegħed il-kornea użati (eż. mudell u speċifikazzjonijiet);

▼ **M7**

- Deskrizzjoni ta' tagħmir iehor użat;
- Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (jiġifieri l-preċiżjoni u l-affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar maż-żmien (eż. ittestjar perijodiku tas-sustanzi kimiċi tal-proficjenza).

Kriterji għal Test Aċċettabbli

- Il-meded aċċettabbli tal-kontrolli pozittivi u negattivi paralleli bbazati fuq dejta storika;
- Jekk applikabbli, il-meded aċċettabbli tal-kontrolli paralleli ta' riferiment bbazati fuq dejta storika.

Il-Ġbir u l-Preparazzjoni tal-Għajnejn

- Identifikazzjoni tas-sors tal-għajnejn (jiġifieri l-faċilità minn fejn ingabru);
- Id-dijametru tal-kornea bhala kejl tal-età u l-annimal sors u l-idoneità għall-assaġġ;
- Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-ħżin tal-għajnejn (eż., id-data u l-hin meta ngabru l-għajnejn, l-intervall tal-hin qabel ma nbeda t-test, il-media tat-trasport u l-kundizzjonijiet tat-temperatura, kwalunkwe antibijotiku li ntuża);
- Il-preparazzjoni u l-immuntar tal-korneji tal-bovini, inklużi dikjarazzjonijiet fuq il-kwalità tagħhom, it-temperatura tal-apparati fejn titqiegħed il-kornea, u l-kriterji għall-għażla tal-korneji użati għall-ittestjar.

Proċedura tat-test

- In-numru ta' repliki użati;
- L-identità tal-kontrolli negattivi u pozittivi użati (jekk applikabbli, anki solvent u l-kontrolli ta' riferiment);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni, il-hin tal-esponiment u l-hin ta' inkubazzjoni wara l-esponiment użati;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' deċiżjoni użati.

Ir-riżultati

- Tabulazzjoni ta' dejta minn kampjuni individwali tat-test (eż. valuri ta' opaċità u OD490 u IVIS ikkalkolat għas-sustanza lkimika tat-test u l-kontrolli pozittivi, negattivi u ta' riferiment [jekk inklużi], irrapportati f'forma ta' tabella, inkluża dejta minn esperimenti ripetuti ta' replika kif ikun xieraq, u l-medji $\pm$ tad-devjazzjoni standard għal kull esperiment);
- Deskrizzjoni ta' effetti osservati oħrajn;
- Il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU *in vitro* derivata, jekk applikabbli.

*Diskussjoni tar-Riżultati**Konklużjoni*

▼ M7

TAGHRIF

- (1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/-MildMod-TMER.htm>.
- (3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.
- (4) UN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.
- (5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.
- (6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Fi: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.
- (7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. Fi: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponibbli fuq: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/-MildMod-TMER.htm>.
- (8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).
- (9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.
- (11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibbli fuq: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].

▼ **M7**

- (12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.
- (17) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/korruzzjoni akuta tal-ghajnejn.
- (18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibbli fuq: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- (19) OECD (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Preċiżjoni: Il-qribija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' "rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika ta' riferiment: Sustanza kimika użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika ta' riferiment għandu jkollha l-proprietajiet li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi kimiċi ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufin; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufin, u (v) potenza magħrufa fl-iskala tar-rispons mixtieq.

Approċċ Minn Isfel Għal Fuq: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li ma tehtiegħ klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv).

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita.

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-ghajn li tiksi l-iris u l-pupilla u thalli d-dawl jghaddi għal gol-parti interna tal-ghajn.

Opaċità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opaċità tal-kornea wara esponiment għal sustanza kimika tat-test. Żieda fl-opaċità tal-kornea hija indikattiva ta' hsara fil-kornea. L-opaċità tista' tiġi evalwata b'mod suġġettiv kif isir fit-test Draize li jsir fuq ghajnejn il-fniek, jew b'mod oġġettiv bi strument bħal pereżempju "opaċitometru".

Permeabilità tal-kornea: Kejl kwantitattiv tal-hsara fl-epitelju tal-kornea billi jiġi ddeterminat l-ammont ta' żebgha fluworexxeina tas-sodju li tghaddi minn gos-saffi kollha taċ-ċelluli tal-kornea.

Irritazzjoni għall-ghajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdiliet fl-ghajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wieċ ta' wara tal-ghajn, li huma kompletament reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti reversibbli fuq l-ghajnejn" u mal-"Kategorija 2 tal-GHS tan-NU" (4).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Periklu: Proprietà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organizzmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Punteġġ tal-Irritazzjoni In Vitro (IVIS): Formula dderivata empirikament użata fil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP li biha l-valuri medji tal-opaċità u tal-permeabilità għal kull grupp tat-trattament jiġu kkombinati f'punteġġ *in vitro* wiehed għal kull grupp tat-trattament. L-IVIS = valur medju tal-opaċità + (15 x valur medju tal-permeabilità).

Effetti irreversibbli fuq l-ghajnejn: Ara "Hsara serja lill-ghajnejn".

▼ **M7**

Tahlita: Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixx (4)

Kontroll negattiv: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Mhux ikklassifikati: Sustanzi kimiċi li mhumiex ikklassifikati għal Irritazzjoni tal-ghajnejn (Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU) jew Hsara serja lill-ghajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU). Interkambjabbli ma' "Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU".

Opaċitometru: Strument li jintuza sabiex ikejjel "l-opaċità tal-kornea" billi jevalwa b'mod kwantitattiv it-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-kornea. L-istrument tipiku jkollu żewġ kompartimenti, kull wieħed minnhom b'sors ta' dawl u fotoċellola tiegħu stess. Kompartiment minnhom jintuza għall-kornea trattata, filwaqt li l-iehor jintuza biex jikkalibra u jizzera l-istrument. Dawl minn lampa alogena jintbagħat minn go kompartiment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal go fotoċellola u jitqabbel mad-dawl mingħut minn ġol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal go fotoċellola. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelloli titqabbel u valur numeriku ta' opaċità jidher fuq displej diġitali.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u ttrattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Effetti irreversibbli fuq l-ghajnejn: Ara "Irritazzjoni għall-ghajnejn".

Affidabilità: Kejljet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduttibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuza l-istess protokoll. Tiġi vvalutata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Hsara serja lill-ghajnejn: Il-produzzjoni ta' hsara fit-tessut fl-ghajnejn, jew tnaqqis fiziku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wieċ quddiem tal-ghajn, li ma jkunux reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti irreversibbli fuq l-ghajnejn" u mal-"Kategorija 1 tal-GHS tan-NU" (4).

Kontroll tas-solvent/veikolu: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (4).

▼ **M7**

Tensjoattiv: Imsejjah ukoll agent tensjoattiv, dan huwa sustanza, bhal detergent, li tista' tnaqqas it-tensjoni fil-wiċċ ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtellja' r-ragħwa jew jippenetra solidi; huwa magħruf ukoll bħala agent li jxarrab.

Tahlita li fiha agent tensjoattiv: Fil-kuntest ta' dan il-metodu ta' ttestjar, din hija tahlita li fiha agent tensjoattiv wiehed jew iktar f'koncentrazzjoni finali ta' > 5 %.

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li tikkawża ħsara serja lill-ghajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-ghajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu negattiv).

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

Strategija ta' ttestjar sekwenzjali: Strategija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċizzjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wiehed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun mehtieg l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-animali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bhal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inkluzi min iħaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-haddiema tal-emergenza) u l-ambjent (4).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU: Ara “Hsara serja lill-ghajnejn”.

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU: Ara “Irritazzjoni għall-ghajnejn”.

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU: Sustanzi kimiċi li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU. Interkambjabbli ma' “Mhux Ikklassifikati”.

Metodu ta' ttestjar ivvalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluzja l-preċiżjoni) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar ivvalidat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' preċiżjoni u affidabilità sabiex jitqies aċċettabbli għall-ghan propost.

Piż tal-evidenza: Il-proċess li fih jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' diversi biċċiet ta' informazzjoni sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konklużjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza kimika li tkun ta' periklu.

▼ **M7***Appendiċi 2***IL-KAPAĊITÀ TA' PREVIŻJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR TAL-BCOP***Tabella 1*

Il-Kapaċità ta' Previżjoni tal-BCOP għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn [Kat 1 vs Mhux Kat 1 (Kat 2 + Ebda Kat) tas-CLP tal-UE/ tal-GHS tan-NU; Kat I vs Mhux Kat I (Kat II + KAT III + KAT IV) tal-EPA tal-Istati Uniti]

Klassifikazzjoni Sistema	Nru	Preċiżjoni		Sensittività		Foloz Negattivi		Speċifità		Foloz pożittivi	
		%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru
GHS tan-NU CLP tal-UE	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
EPA tal-Istati Uniti	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Tabella 2

Il-Kapaċità ta' Previżjoni tal-BCOP għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn ["mhux irritanti"] [Ebda Kat vs Mhux Ebda Kat (Kat 1 + Kat 2) tas-CLP tal-UE/ tal-GHS tan-NU; Kat IV vs Mhux Kat IV (Kat I + Kat II + Kat III) tal-EPA tal-Istati Uniti]

Klassifikazzjoni Sistema	Nru	Preċiżjoni		Sensittività		Foloz Negattivi		Speċifità		Foloz pożittivi	
		%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru	%	Nru
GHS tan-NU CLP tal-UE	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
EPA tal-Istati Uniti	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼ M7

Appendiċi 3

SUSTANZI KIMIĊI TA' PROFIĊJENZA GHALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-BCOP

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-hsara lill-ghajnejn ta' 13-il sustanza kimika rakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħazlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli tal-ghajnejn fuq il-bażi tar-riżultati fit-test *in vivo* fuq l-ghajnejn tal-fniek (TG 405) (17) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Mhux Ikklassifikati) (4). Kriterji tal-ghazla oħrajn kienu li s-sustanzi kimiċi huma disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni, u li hemm dejta *in vitro* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni mill-metodu ta' ttestjar tal-BCOP. Hemm dejta ta' referenza disponibbli fid-Dokument Sommarju Simplifikat (3) u fid-Dokument ta' Revizjoni ta' Sfond tal-ICCVAM għall-metodu ta' ttestjar tal-BCOP (2)(18).

Tabella 1

Is-sustanzi kimiċi rakkomandati għall-wiri tal-profiċjenza teknika bil-metodu ta' ttestjar tal-BCOP

Sustanza Kimika	CASRN	Sustanza Kimika tal-Klassi ⁽¹⁾	Forma Fizika	Klassifikazzjoni ⁽⁰⁾ <i>In Vivo</i>	Klassifikazzjoni tal-BCOP
Klorur tal-benzalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Dibenzojl-L- aċidu tartariku	2743-38-6	Aċidu karbossiliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Imidazol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Aċidu trikloroaċetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Klorur ta' 2,6-diklorobenzojl	4659-45-4	Aloġenur tal-aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Ma tista' ssir ebda previzjoni preċiża/affidabbli
Etil-2-metil-aċeto-aċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2 B	Ma tista' ssir ebda previzjoni preċiża/affidabbli
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melħ inorganiku	Solidu	Kategorija 2 ⁽¹⁾	Ma tista' ssir ebda previzjoni preċiża/affidabbli
EDTA, melħ di-potassju	25102-12-9	Ammin, Aċidu karbossiliku (melħ)	Solidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat
Tween 20	9005-64-5	Ester, Polietere	Likwidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat
2-Merkaptopirimidina	1450-85-7	Aloġenur tal-aċil	Solidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat
Fenilbutazon	50-33-9	Eteroċikliku	Solidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat

▼ **M7**

Sustanza Kimika	CASRN	Sustanza Kimika tal-Klassi ⁽⁻¹⁾	Forma Fizika	Klassifikazzjoni ⁽⁰⁾ <i>In Vivo</i>	Klassifikazzjoni tal-BCOP
Poliossietilen 23 lauril eter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Likwidu	Mhux ikklassifikat	Mhux ikklassifikat

Taqsiriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstracts Service

⁽⁻¹⁾ Klassijiet tas-sustanzzi kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza kimika tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, fuq il-bażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-Librerija Nazzjonali tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi tal-Medicina (MeSH) (disponibbli fuq <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽⁰⁾ Fuq il-bażi tar-riżultati mit-test in vivo fuq għajnejn il-fniek (OECDTG 405) (17) u bl-użu tal-GHS tan-NU (4).

⁽¹⁾ Klassifikazzjoni bhala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri 1 minn 3 vs. 2 minn 3 annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji sabiex tiġi ġġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju in vivo kien jinkludi 3 annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-hmura konguntivali f'annimal wiehed irkupraw għal punteġġ ta' zero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkupraw għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' hmura konguntivali ta' 1 (fil-jum 7) li rkupraw għalkollox fil-jum 10.

▼ M7

Appendiċi 4

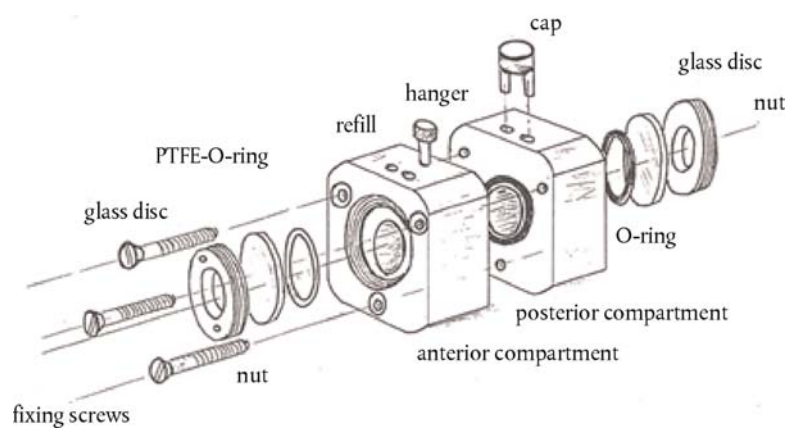
L-APPARAT TAL-BCOP FEJN TITQIEGHED IL-KORNEA

L-apparat tal-BCOP fejn titqiegħed il-kornea huwa magħmul minn materjal inert (eż. polipropilen). L-apparat huwa magħmul minn żewġ nofsijiet (kavità anterjuri u oħra posterjuri), u għandu żewġ kavitajiet interni ċilindriċi simili. Kull kavità hija mfassal sabiex tiflah volum ta' madwar 5 ml u tintemm f'tieqa tal-ħġieġ, li minnha jiġu rreġistrati l-kejl tal-opaċità. Kull waħda mill-kavitajiet interni għandha dijametru ta' 1,7 cm u fond ta' 2,2 cm⁽¹⁾. Iċ-ċirku-o jitqiegħed fil-kavità posterjuri biex jipprevjeni kwalunkwe tnixxija. Il-korneji jitqiegħdu bil-parti tal-endotelju thares 'l isfel fuq iċ-ċirku-o tal-kavitajiet posterjuri u l-kavitajiet anterjuri jitqiegħdu fuq il-parti tal-epitelju tal-korneji. Il-kavitajiet jinżammu f'pothom permezz ta' tliet viti tal-azzar inossidabbli li jinsabu fuq it-truf esterni tal-kavità. Fl-aħħar parti ta' kull kavità nsibu tieqa tal-ħġieġ li tista' titneħħa sabiex ikun hemm aċċess faċli għall-kornea. Ċirku-o jitqiegħed ukoll bejn it-tieqa tal-ħġieġ u l-kavità biex jipprevjeni kwalunkwe tnixxija. Żewġ toqbiet fil-parti ta' fuq ta' kull kavità jippermettu l-introduzzjoni u t-tneħħija tal-medium u s-sustanzi kimiċi tat-test. Dawn jingħalqu b'tappijiet tal-lastku waqt il-perjodi ta' trattament u ta' inkubazzjoni. It-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea għandha l-potenzjal li tinbidel peress li l-effetti ta' xedd u kedd jew il-ġmigh ta' residwi kimiċi speċifiċi fit-toqob tal-kavità interna jew fuq it-twieqi tal-ħġieġ jistgħu jaffettwaw it-tifrix jew ir-riflettanza tad-dawl. Il-konsegwenza tista' tkun żidiet jew tnaqqisiet fit-trażmissjoni tad-dawl bażi (u, b'mod kuntrarju, il-valuri tal-opaċità bażi) minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea, u tista' tkun evidenti peress li bidliet sinifikanti fil-kejl inizzjali bażi mistennjin tal-opaċità tal-kornea fil-kavitajiet individwali (jiġifieri l-valuri tal-opaċità tal-kornea inizzjali f'apparati speċifiċi individwali tal-kornea jistgħu jvarjaw spiss b'aktar minn 2 jew 3 unitajiet tal-opaċità mill-valuri bażi mistennjin). Kull laboratorju għandu jikkunsidra jistabbilixxi programm għall-evalwazzjoni ta' tibdiliet fit-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea, skont in-natura tal-kimiċi ttestjati u l-frekwenza tal-użu tal-kavitajiet. Sabiex jiġu stabbiliti l-valuri bażi, l-apparati fejn titqiegħed il-kornea jistgħu jiġu vverifikati qabel ma jsir użu ta' rutina billi jitkejlu l-valuri tal-opaċità bażi (jew it-trażmissjoni tad-dawl) tal-kompartimenti b'medium komplut, mingħajr kornei. Imbagħad, l-apparati li jżommu l-korneji jiġu verifikati b'mod perijodiku għal tibdiliet fit-trażmissjoni tad-dawl matul il-perjodi tal-użu. Kull laboratorju jista' jistabbilixxi l-frekwenza għall-verifika tal-apparati fejn titqiegħed il-kornea, fuq il-bażi tas-sustanzi kimiċi ttestjati, il-frekwenza tal-użu, u l-osservazzjonijiet tat-tibdiliet fil-valuri bażi tal-opaċità tal-kornea. Jekk jiġu osservati tibdiliet notevoli fit-trażmissjoni tad-dawl minn ġol-apparati fejn titqiegħed il-kornea, iridu jiġu kkunsidrati proċeduri xierqa ta' tindif u/jew illostrar tal-wiċċ ta' ġewwa tal-apparati fejn titqiegħed il-kornea jew is-sostituzzjoni ta' dawn.

⁽¹⁾ Id-dimensjonijiet ipprovduti huma bbazati fuq apparat fejn titqiegħed il-kornea li jintuza għal baqar ta' età li tvarja minn 12-il xahar sa 60 xahar. Fl-eventwalità li jintużaw annimali ta' età minn 6 xhur sa 12-il xahar, l-apparat minflok ikollu jiġi ddisinjat b'tali mod li kull kavità tesa' volum ta' 4 mL, u kull waħda mill-kavitajiet interni tkun ta' dijametru ta' 1,5 cm u fond ta' 2,2 cm. Fi kwalunkwe apparat iddisinjat għid fejn titqiegħed il-kornea, huwa importanti hafna li l-proporzjon tal-erja tas-superfiċje tal-kornea esposta mal-volum tal-kavità posterjuri ikun daqs il-proporzjon fl-apparat tradizzjonali. Dan huwa meħtieġ sabiex jiġi żgurat li l-valuri tal-permeabilità jiġu ddeterminati b'mod korrett għall-kalkolu tal-IVIS permezz tal-formula proposta

▼ **M7**

Apparat fejn titqiegħed il-kornea: dijagramma bi spjega tal-installazzjoni



▼ **M7***Appendiċi 5***L-OPAĊITOMETRU**

L-opaċitometru huwa apparat li jkejjel it-trażmissjoni tad-dawl. Pereżempju, għal tagħmir OP-KIT minn Electro Design (Riom, Franza) użat fil-validazzjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-BCOP, id-dawl minn lampa aloġena jintbagħat minn ġo kompartment ta' kontroll (kavità vojta mingħajr twieqi jew likwidu) għal ġo fotoċellola u jitqabbel mad-dawl mingħut minn ġol-kompartiment sperimentali, fejn tinsab il-kavità li fiha l-kornea, għal ġo fotoċellola. Id-differenza fit-trażmissjoni tad-dawl mill-fotoċelloli titqabbel u valur numeriku ta' opaċità jidher fuq displej diġitali. L-unitajiet tal-opaċità huma stabbiliti. Jistgħu jintużaw tipi oħrajn ta' opaċitometri b'isettjar differenti (eż. li ma jehtigux il-kejl tal-kompartimenti tal-kontroll u tal-esperiment) jekk jintwera bil-provi li dawn jagħtu riżultati simili għat-tagħmir ivalidat.

L-opaċitometru għandu jipprovdi rispons lineari minn skala ta' qari ta' valuri ta' opaċità li jkopru l-valuri tal-limiti użati għal klassifiki differenti deskritti mill-Mudell ta' Tbassir (jiġifieri sal-valur tal-limitu li jindika korrużjoni/irritazzjoni severa). Sabiex jiġi żgurat qari ta' valuri lineari u akkurat sa 75-80 unità ta' opaċità, jehtieg li l-opaċitometru jiġi kkalibrat bl-użu ta' sensiela ta' kalibraturi. Il-kalibraturi jitqieghdu fil-kavità tal-kalibraġġ (kavità tal-kornea mfassla sabiex iżzomm fiha l-kalibraturi) u jinqraw fuq l-opaċitometru. Il-kavità tal-kalibraġġ hija ddisinjata b'tali mod li l-kalibraturi jinzammu bejn wiehded u ieħor fl-istess distanza bejn id-dawl u l-fotoċellola fejn ikunu sejrin jitqieghdu l-korneji waqt il-kejl tal-opaċità. Il-valuri ta' referenza u l-valur programmat inizjali skont it-tip ta' tagħmir użat. Il-linearità tal-kejl tal-opaċità għandha tiġi żgurata permezz ta' proċeduri xierqa (speċifiċi għall-istrument). Pereżempju, għat-tagħmir OP-KIT minn Electro Design (Riom, Franza), l-opaċitometru l-ewwel jiġi kkalibrat għal 0 unitajiet tal-opaċità bl-użu tal-kavità tal-kalibraġġ mingħajr kalibratur. Imbagħad tliet kalibraturi differenti jitqieghdu fil-kavità tal-kalibraġġ wiehded wiehded u jitkejlu l-opaċitajiet. Il-kalibraturi 1, 2 u 3 għandhom jirriżultaw f'qari ta' valuri tal-opaċità daqs il-valuri stabbiliti tagħhom ta' 75, 150, u 225 unità ta' opaċità, rispettivament, $\pm 5\%$.

▼M7

B.48. METODU TA' TTESTJAR TAL-GHAJNEJN TAT-TIGIEĠ IŻOLATI GĦALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' D) SUSTANZI KIMIČI LI JINDUČU HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN U II) SUSTANZI KIMIČI LI MA JEHTIĠUX KLASSIFIKAZZJONI GĦAL IRRITAZZJONI TAL-GHAJNEJN JEW HSARA SERJA LILL-GHAJNEJN

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 438 tal-OECD (2013). Il-metodu ta' ttestjar tal-Għajnejn tat-Tigieġ Iżolati (ICE) ġie evalwat mill-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interagenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM), flimkien maċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Ċentru Gappuniz għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM), fl-2006 u l-2010 (1) (2) (3). Fl-ewwel evalwazzjoni, l-ICE ġie approvat bħala metodu ta' ttestjar xjentifikament validu għall-użu bħala test ta' skrinjar sabiex jidentifika sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) li jinduċu hsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1), kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) (2) (4) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Tahlitiet (CLP) ⁽¹⁾. Fit-tieni evalwazzjoni, il-metodu ta' ttestjar tal-ICE ġie evalwat għall-utilità tiegħu sabiex jidentifika sustanzi kimiċi mhux ikklassifikati għal irritazzjoni tal-għajnejn jew hsara serja lill-għajnejn kif definita mill-GHS tan-NU (3) (4). Ir-riżultati mill-istudju ta' validazzjoni u r-rakkomandazzjonijiet tal-bord ta' evalwazzjoni bejn il-pari żammew ir-rakkomandazzjoni oriġinali għall-użu tal-ICE għall-klassifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-għajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU), peress li d-database disponibbli baqgħet l-istess mill-validazzjoni tal-ICCVAM oriġinali. F'dak l-istadju, ma għet issuġġerita ebda rakkomandazzjoni ulterjuri għal espansjoni tad-dominju ta' applikabilità tal-ICE sabiex ikunu inkluzi kategoriji oħrajn. Saret rievalwazzjoni tas-sett ta' dejta *in vitro* u *in vivo* użat fl-istudju ta' validazzjoni b'enfasi fuq l-evalwazzjoni tal-utilità tal-ICE sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn jew hsara serja lill-għajnejn (5). Din ir-rievalwazzjoni kkonkludiet li l-metodu ta' ttestjar tal-ICE jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-għajnejn u hsara serja lill-għajnejn kif definita mill-GHS tan-NU (4) (5). Dan il-metodu ta' ttestjar jinkludi l-użi rakkomandat u l-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE fuq il-bażi ta' dawn l-evalwazzjonijiet. Id-differenzi ewlenin bejn il-verżjoni oriġinali tal-2009 u l-verżjoni aġġornata tal-2013 tal-linja gwida tat-test tal-OECD jinkludu, iżda mhumiex limitati għal: l-użu tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni skont is-Sistema ta' Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU, aġġornament fl-elementi tar-rapport tat-test, aġġornament tal-Appendiċi 1 dwar id-definizzjonijiet, u aġġornament tal-Appendiċi 2 dwar is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza.

Generalment huwa aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test *in vitro* tal-irritazzjoni tal-għajnejn wahdu ma huwa sejjer ikun kapaċi jiehu post it-test Draize *in vivo* tal-għajnejn sabiex ibassar il-medda shiha ta' irritazzjonijiet għal klassijiet ta' sustanzi kimiċi differenti. Madankollu, tahlitiet strateġiċi ta' diversi metodi ta' ttestjar alternattivi fi hdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu kapaċi jiehdhu post it-test Draize tal-għajnejn (6). L-approċċ minn Fuq għal Isfel (7) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija li jkollha potenzjal għoli ta' irritazzjoni, filwaqt li l-approċċ minn Isfel għal Fuq (7) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika ma tkunx mistennija tikkaġuna biżżejjed irritazzjoni tal-għajnejn sabiex tkun tehtieg li tigi kklassifikata. Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti

⁽¹⁾ Regolament (KE) Nru 1272/2008 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tas-16 ta' Diċembru 2008 dwar il-klassifikazzjoni, l-ittikettar u l-imballaġġ tas-sustanzi u t-tahlitiet, li jemenda u jhassar 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

▼M7

ċirkustanzi u fi hdan limitazzjonijiet speċifiċi kif deskritti fil-paragrafi 8 sa 10 għall-klassifikazzjoni tal-periklu għall-ghajnejn u t-tikkettar ta' sustanzi kimiċi. Filwaqt li ma jitqiesx li huwa validu bħala sostitut awtonomu għat-test *in vivo* tal-ghajnejn fuq il-fniek, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP huwa rakkomandat bħala pass inizjali fi hdan strateġija ta' ttestjar, bħall-approċċ minn Fuq għal Isfel issuggerit minn Scott *et al.* (7) sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, minghajr ma jsiru iktar testijiet (4). Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE huwa rakkomandat ukoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, kif definiti mill-GHS tan-NU (Ebda Kategorija, NC) (4) u għalhekk jista' jintuza bħala l-ewwel pass fi hdan approċċ ta' strateġija ta' ttestjar minn Isfel għal Fuq (7). Madankollu, sustanza kimika li mhijiex prevista li tikkaġuna hsara serja lill-ghajnejn jew bħala mhux klassifikata għal irritazzjoni tal-ghajnejn/hsara serja lill-ghajnejn bil-metodu ta' ttestjar tal-ICE tkun tehtieg iktar testijiet (*in vitro* u/jew *in vivo*) sabiex tistabbilixxi klassifikazzjoni definittiva. Barra minn hekk, għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel ma l-ICE jintuza f'approċċ minn isfel għal fuq skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn li mhumix il-GHS tan-NU.

L-ghan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanza kimika tat-test tikkawża periklu għall-ghajnejn kif imkejjel mill-hila tagħha li tinduċi jew le tossiċità f'ghajnejn enukleata ta' tiġieġa. Effetti tossiċi għall-kornea jitkejlu permezz ta' (i) valutazzjoni kwalitattiva tal-opaċità, (ii) valutazzjoni kwalitattiva tal-hsara għall-epitelju fuq il-baži tal-applikazzjoni tal-fluworexxeina fl-ghajnejn (żamma tal-fluworexxeina), (iii) kejl kwantitattiv ta' zieda fil-hxuna (nefha), u (iv) evalwazzjoni kwalitattiva ta' hsara morfologika makroskopika fis-superfiċje. Il-valutazzjonijiet tal-opaċità, tan-nefha, u tal-hsara fil-kornea wara l-esponiment għal sustanza kimika tat-test jiġu vvalutati b'mod individwali u jiġu kkombinati sabiex tiġi dderivata Klassifikazzjoni tal-Irritazzjoni tal-Ghajnejn.

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll issuggerit fid-Dokument ta' Gwida 160 tal-OECD (8), li ġie żvilupp b'segwitu għal studju ta' validazzjoni internazzjonali tal-ICCVAM (1) (3) (9), b'kontribuzzjonijiet minghand iċ-Centru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) u ċ-Centru Ġappuniz għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi, u d-Dipartiment tat-Tossikoloġija u l-Farmakoloġija Applikata tat-TNO Kwalità tal-Hajja (in-Netherlands). Il-protokoll huwa bbażat fuq informazzjoni miksuba minn protokolli ppubblikati, kif ukoll il-protokoll attwali użat mit-TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Saru testijiet fuq firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi fil-validazzjoni li hija l-baži ta' dan il-metodu ta' ttestjar u d-database empirika tal-istudju ta' validazzjoni rriżultaw f'152 sustanza kimika inkluzi 72 sustanza u 80 tahlita (5). Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għal solidi, likwidi, emulsjonijiet u ġellijiet. Il-likwidi jistgħu jkunu jew ma jkunux milwiema; is-solidi jistgħu jkunu jew ma jkunux solubbli fl-ilma. Il-gassijiet u l-aerosols għadhom ma ġewx eżaminati fi studju ta' validazzjoni.

Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE jista' jintuza sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn, jiġifieri sustanzi kimiċi li jiġu klassifikati taħt il-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU (4). Meta jintużaw għal dan il-ghan, il-limitazzjonijiet identifikati għall-metodu ta' ttestjar tal-ICE huma bbażati fuq ir-rati għoljin ta' foloz pożittivi għal alkohols u r-rati għoljin ta' foloz negattivi għal solidi u aġenti tensjoattivi (1) (3) (9). Barra minn hekk, f'dan il-kuntest ir-rati ta' foloz negattivi (tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU identifikati li mhumix tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU) mhumix kritiċi peress li s-sustanzi kimiċi kollha tat-test li jiġu negattivi mbagħad jiġu ttestjati b'test(ijiet) *in vitro* vvalidat b'mod adegwat iehor, jew bħala l-aħħar alternattiva, fil-fniek, skont ir-rekwiziti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piz tal-evidenza. Ta'

▼ M7

min jinnota li s-solidi jistgħu jwasslu għal kundizzjonijiet varjabbli u ta' esponiment estrem fit-test Draize *in vivo* tal-irritazzjoni tal-ghajnejn, li jitsgħu jirriżultaw fi previżjonijiet irrilevanti tal-potenzjal ta' irritazzjoni veru tagħhom (15). L-investigaturi għandhom jikkunsidraw jużaw dan il-metodu ta' ttestjar għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, f'liema każ riżultat pożittiv għandu jiġi aċċettat bħala indikatur ta' ħsara serja lill-ghajnejn, jiġifieri klassifikazzjoni bħala tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU mingħajr ma jsiru iktar testijiet. Madankollu, riżultati pożittivi miksba bl-alkohols għandhom jiġu interpretati b'ċerta kawtela minhabba r-riskju ta' tbassir eċċessiv.

Meta jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jinduċu ħsara serja lill-ghajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU), il-metodu ta' ttestjar tal-ICE għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 86 % (120/140), rata ta' foloz pożittivi ta' 6 % (7/113) u rata ta' foloz negattivi ta' 48 % (13/27) meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* fuq ghajnejn il-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4) (5).

Il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP jista' jintuża wkoll sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew ħsara serja lill-ghajnejn, skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4). Għandhom jiġu kkonsultati l-awtoritajiet regolatorji xierqa qabel ma l-ICE jintuża f'approċċ minn isfel għal fuq skont skemi ta' klassifikazzjoni oħrajn. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għat-tipi kollha ta' sustanzi kimiċi, fejn riżultat negattiv jista' jiġi aċċettat għan-nuqqas ta' klassifikazzjoni ta' sustanza kimika għal irritazzjoni tal-ghajnejn u ħsara serja lill-ghajnejn. Madankollu, fuq il-bażi ta' riżultat wieħed mid-database tal-validazzjoni, żebgħa antifouling li fiha solvent organiku tista' tkun sottovalutata fil-previżjonijiet (5).

Meta jintuża sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni għal irritazzjoni tal-ghajnejn u ħsara serja lill-ghajnejn, il-metodu ta' ttestjar tal-ICE għandu preċiżjoni kumplessiva ta' 82 % (125/152), rata ta' foloz pożittivi ta' 33 % (26/79) u rata ta' foloz negattivi ta' 1 % (1/73) meta mqabbel mad-dejta tal-metodu ta' ttestjar *in vivo* fuq ghajnejn il-fniek ikklassifikat skont is-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4) (5). Meta s-sustanzi kimiċi tat-test fi hdn ċerti klassijiet (jiġifieri antifouling żebgħat li fiha solvent organiku) jiġu esklużi mid-database, il-preċiżjoni tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE hija ta' 83 % (123/149), ir-rata ta' foloz pożittivi 33 % (26/78), u r-rata ta' foloz negattivi ta' 0 % (0/71) għas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (4) (5).

Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE mhuwiex rakkomandat għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala irritanti għall-ghajnejn (jiġifieri Kategorija 2 jew Kategorija 2A tal-GHS tan-NU) jew sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jiġu klassifikati bħala ftit irritanti għall-ghajnejn (Kategorija 2B tal-GHS tan-NU) minhabba n-numru konsiderevoli ta' sustanzi kimiċi tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU bħala sustanzi kimiċi tal-Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU u ta' Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU sovraklassifikati bħala Kategorija 2, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU. Għal dan il-ghan, jista' jkun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet b'metodu xieraq ieħor.

Il-proċeduri kollha li jinvolvu ghajnejn tat-tiġieġ għandhom isegwu r-regolamenti u l-proċeduri applikabbli tal-installazzjoni tal-ittestjar f'dak li għandu x'jaqsam mal-manipulazzjoni ta' materjali derivati mill-bnedmin jew l-annimali, li jinkludu, iżda li mhumiex limitati għal, tessuti u fluwidi tat-tessuti. Huwa rakkomandat li jittiehdu l-prekawżjonijiet universali tal-laboratorju (16).

Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-ICE ma jqisx feriti konguntivali u iridali kif evalwati fil-metodu ta' ttestjar tal-irritazzjoni okulari fil-fniek, dan jindirizza l-effetti korneali, li huma kawża primarja tal-klassifikazzjoni *in vivo* meta titqies il-Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU. Barra dan, għalkemm ir-reversibilità tal-feriti fil-kornea ma tistax tiġi evalwata *per se* fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE, gie propost, fuq il-bażi ta' studji fuq ghajnejn il-fniek, li valutazzjoni tal-fond inizjali

▼ M7

tal-ferita fil-kornea tista' tintuża sabiex jiġu identifikati uħud mit-tipi ta' effetti irreversibbli (17). B'mod partikolari, hemm bżonn ta' iktar għarfien xjentifiku sabiex nifhemu kif isehhu effetti irreversibbli mhux marbtin ma' ferita inizjali ta' livell għoli. Fl-aħħar nett, il-metodu ta' ttestjar tal-BCOP ma jippermettix li ssir valutazzjoni tal-potenzjal għal tossiċità sistemika assoċjata ma' esponiment okulari.

Dan il-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi aġġornat kull ċertu żmien iktar ma jkun hemm informazzjoni u dejta godda kkunsidrati. Pereżempju, l-istopatoloġija tista' tkun potenzjalment siewja meta jkun hemm bżonn ta' karatterizzazzjoni iktar kompluta tal-ħsara fil-kornea. Sabiex jevalwaw din il-possibbiltà, dawk li jużaw huma mhegġin jippreservaw l-ghajnejn u jhejju kampjuni għall-istopatoloġija li jistgħu jintużaw sabiex jiġu żviluppati database u kriterji dwar id-deċiżjonijiet li jistgħu jkomplu jtejbju l-preċiżjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar. L-OECD żviluppat Dokument ta' Gwida dwar l-użu ta' metodi ta' ttestjar tat-tossiċità okulari *in vitro*, li jinkludi proċeduri dettaljati dwar il-ġbir ta' kampjuni tal-istopatoloġija u informazzjoni dwar fejn għandhom tiġi sottomessa dejta dwar il-kampjuni u/jew l-istopatoloġija (8).

Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qiegħed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 2. Laboratorju jista' juża dawn is-sustanzi kimiċi sabiex juri l-kompetenza teknika tiegħu fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE qabel ma jissottometti dejta tal-ICE għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

IL-PRINCIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-ICE huwa mudell organotipiku li jipprovdi manutenzjoni fuq terminu ta' żmien qasir fuq għajnejn it-tigieġ *in vitro*. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-ħsara mis-sustanza kimika tat-test tiġi vvalutata bid-determinazzjoni tan-nefha, l-oपाँत u ż-żamma tal-fluworexxena fil-kornea. Filwaqt li l-aħħar żewġ parametri jinvolvu valutazzjoni kwalitattiva, analiżi tan-nefha fil-kornea tipprovdi valutazzjoni kwantitattiva. Kull kejl jiġi kkonvertit f'puntegġ kwantitattiv użat għall-kalkolu ta' Indici tal-Irritazzjoni Kumplessiv, jew inkella jiġi assenjat kategorizzazzjoni kwalitattiva li tintuża sabiex tiġi assenjata klassifikazzjoni tal-periklu okulari *in vitro*, jew bhala Kategorija 1 tal-GHS tan-NU jew bhala mhux klassifikat fil-GHS tan-NU. Imbagħad jista' jintuża wiehed minn dawn l-eżiti sabiex jitbassar il-potenzjal ta' ħsara serja lill-ghajnejn *in vivo* jew ebda rekwiżit għall-klassifikazzjoni ta' periklu għall-ghajnejn ta' sustanza kimika tat-test (ara l-Kriterji tad-Deċiżjoni). Madankollu, ma tista' tingħata ebda klassifikazzjoni għal sustanzi kimiċi li mhumiex previsti li jikkawgħaw ħsara serja lill-ghajnejn jew li mhumiex ikklassifikati bil-metodu ta' ttestjar tal-ICE (ara l-paragrafu 11).

Sors u Età ta' Għajnejn it-Tigieġ

Storikament, għal dan l-assaġġ intużaw għajnejn li jkunu ttiehdu mit-tigieġ minn biċċerija fejn jinqatlu għall-konsum mill-bniedem, u b'hekk giet eliminata l-ħtieġa ta' annimali tal-laboratorju. Jintużaw biss għajnejn ta' annimali b'saħħithom li huma xierqa sabiex jidhlu fil-katina alimentari tal-bniedem.

Għalkemm ma twettaq l-ebda studju kontrollat għall-valutazzjoni tal-età ideali tat-tigieġ, l-età u l-piż tat-tigieġ użati storikament f'dan il-metodu ta' ttestjar huma dawk ta' tigieġ tar-rebbiegħa li tradizzjonalment jiġu pproċessati minn biċċerija tat-tjur (jiġifieri bejn wiehed u iehor ta' età ta' 7 ġimghat, u piż ta' 1.5 — 2.5 kg).

Ġbir u Trasport tal-Għajnejn lejn il-Laboratorju

L-irjus għandhom jitnehhew immedjatament wara s-sedazzjoni tat-tigieġ, generalment b'xokk elettriku u inciżjoni tal-ghonq għall-fsada. Għandu jiġi lokalizzat sors lokali ta' tigieġ qrib il-laboratorju sabiex l-irjus tat-tigieġ jiġu ttrasferiti mill-biċċerija sal-laboratorju malajr biżżejjed sabiex kemm jista' jkun jonqos/tonqos id-deterjorament u/jew il-kontaminazzjoni mill-batterji. L-intervall tal-hin li jgħaddi minn meta jingħabru l-irjus tat-tigieġ u t-tqegħid tal-ghajnejn fil-kavità tas-superfużjoni wara l-enuklerazzjoni għandu jtnaqqas kemm jista' jkun (normalment fi żmien sagħtejn) sabiex jiġi żgurat li jintlaħqu l-kriterji ta' aċċet-tazzjoni tal-assaġġ. L-ghajnejn kollha użati fl-assaġġ għandhom ikunu mill-istess grupp ta' għajnejn miġbura f'għurnata speċifika.

▼M7

Minhabba l-fatt li l-ghajnejn jiġu ddissektjati fil-laboratorju, l-irjus intatti jiġu trasportati mill-biċċerija f'temperatura ambjentali (normalment bejn 18 °C u 25 °C) f'kaxx tal-plastik umdifikati b'karti mxarrba b'soluzzjoni izotonika ta' ilma bil-melh.

Il-Kriterji tal-Għażla u n-Numru ta' Ghajnejn Użati fl-ICE

Ghajnejn li jkollhom punteġġ għoli ta' tilwin bil-fluworexxeina (jiġifieri > 0.5) jew punteġġ għoli ta' opacità fil-kornea (jiġifieri > 0.5) wara li jitnehhew mill-hofra tal-ghajn jitwarbu.

Kull grupp tat-trattament u tal-kontroll pożittiv parallel jikkonsisti minn tal-anqas tliet ghajnejn. Il-grupp tal-kontrolli negattivi jew il-kontroll tas-solvent (jekk jintuza solvent li ma jkunx salina) jikkonsisti minn tal-anqas ghajn wahda.

Fil-każ ta' materjali solidi li jwasslu għal eżitu ta' NC tal-GHS, huwa rakkomandat li tintuza t-tieni sensiela ta' tliet ghajnejn sabiex jiġi kkonfermat jew miċhud ir-riżultat negattiv.

PROCEDURA

Preparazzjoni tal-Ghajnejn

Il-kappell tal-ghajn jinqata' barra b'hafna attenzjoni sabiex ma ssir l-ebda hsara fil-kornea. L-integrità tal-kornea tiġi vvalutata malajr b'qatra fluworexxeina tas-sodju 2 % (w/v) li tiġi applikata fuq is-superficcje tal-kornea għal ftit sekondi, u mbagħad titlahh b'salina izotonika. Imbagħad l-ghajnejn ittrattati bil-fluworexxeina jiġu eżaminati b'mikroskopju korneali sabiex jiġi żgurat li l-kornea ma jkollha l-ebda hsara (jiġifieri punteġġi taz-żamma tal-fluworexxeina u tal-opacità tal-kornea ≤ 0.5).

Jekk l-ghajn ma jkollha l-ebda hsara, tinqata' mill-kranju b'attenzjoni kbira sabiex ma ssir l-ebda hsara lill-kornea. Il-boċċa tal-ghajn tingħibed mill-orbita billi wiehed iżomm sod il-membrana nittitanti b'forċipi kirurġiċi, u l-muskoli tal-ghajn jinqatghu b'imqass mgħawweġ u b'ponta spuntata. Huwa importanti li wiehed jevita li jikkawża hsara fil-kornea minhabba pressjoni eċċessiva (jiġifieri artefatti ta' kompressjoni.)

Meta l-ghajn titneħħa mill-orbita, porzjon viżibbli tan-nerv ottiku għandu jibqa' mwahhal. Ladarba titneħħa mill-orbita, l-ghajn titqiegħed fuq kuttunar assorbenti u l-membrana nittitanti u tessut konnettiv iehor jinqatghu.

L-ghajn imneħħija mill-hofra tagħha titqiegħed fuq klamp tal-azzar inossidabbli b'tali mod li l-kornea tkun f'pożizzjoni vertikali. Imbagħad il-klamp jiġi ttrasferit f'kavità fl-apparat tas-superfużjoni (18). Il-klampijiet għandhom jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni b'tali mod li l-kornea shiha tiġi fornita bid-drip salina izotonika (3-4 taqtiriet fil-minuta jew 0.1 sa 0.15 ml/min). Il-kavitajiet tal-apparat tas-superfużjoni għandu jkollhom temperatura kkontrollata ta' 32 ± 1.5 °C. L-Appendiċi 3 jipprovdi dijagramma ta' apparat tipiku tas-superfużjoni u l-klampijiet tal-ghajnejn, li jistgħu jinxtraw jew jinbnew. L-apparat jista' jitbiddel sabiex jissodisfa l-htigijiet ta' laboratorju individwali (eż. biex jakkomoda għadd differenti ta' ghajnejn).

Wara li jitqiegħdu fl-apparat tas-superfużjoni, l-ghajnejn jergħu jiġu eżaminati b'mikroskopju tal-kornea sabiex jiġi żgurat li ma tkun saritilhom l-ebda hsara waqt il-proċedura tad-dissezzjoni. Il-hxuna tal-kornea fil-quċcata tal-kornea għandha tikejje ukoll issa bl-użu tal-apparat li jkejjel il-fond fuq il-mikroskopju korneali. Ghajnejn b'; (i) punteġġ ta' żamma ta' fluworexxeina ta' > 0.5; (ii) opacità korneali > 0.5; jew, (iii), kwalunkwe sinjal addizzjonali ta' hsara għandhom jiġu ssostitwiti. Għal ghajnejn li ma jintremewx fuq il-bażi ta' kwalunkwe wiehed minn dawn il-kriterji, ghajnejn individwali bi hxuna tal-kornea li tiddevja b'aktar minn 10 % mill-valur medju għall-ghajnejn kollha għandhom jintremew. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji korneali jistgħu jagħtu kejl differenti tal-hxuna tal-kornea jekk l-issettjar tal-wisgha tal-fetha jkun differenti. Il-wisgha tal-fetha għandha tkun stabbilita għal 0,095 mm.

▼ **M7**

Ladarba l-ghajnejn kollha jiġu eżaminati u approvati, l-ghajnejn jiġu inkubati għal madwar 45 sa 60 minuta sabiex jiġu ekwilibriati mas-sistema tat-test qabel id-dożaġġ. Wara l-perjodu ta' ekwilibrazzjoni, jiġi rreġistrat il-punt zero ta' referenza għall-hxuna u l-opaċità tal-kornea sabiex iservi bħala bażi (jiġifieri $hin = 0$). Il-punteġġ tal-fluorexxenza ddeterminat fid-dissezzjoni jintuża bħala l-ewwel kejl għal dak il-punt ta' tmiem.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Eżatt wara l-kejl tal-punt zero ta' referenza, l-ghajn (fl-apparat fejn titqiegħed) titneħħa mill-apparat tas-superfużjoni, titqiegħed f'pożizzjoni orizzontali, u s-sustanza kimika tat-test tiġi applikata fuq il-kornea.

Sustanzi kimiċi tat-test likwidi tipikament jiġu ttestjati mhux iddilwiti, iżda jistgħu jiġu ddilwiti jekk dan jitqies neċessarju (eż. bħala parti mit-tfassil tal-istudju). Is-solvent preferut għas-sustanzi kimiċi tat-test dilwiti huwa s-salina fiżjoloġika. Madankollu, jistgħu jintużaw solventi alternattivi ukoll f'kundizzjonijiet ikkontrollati, iżda għandu jintwera li dawn ikunu solventi xierqa biex jintużaw minflok is-salina fiżjoloġika.

Sustanzi kimiċi tat-test likwidi jiġu applikati fuq il-kornea b'tali mod li s-superficie shiha tal-kornea tkun miksija b'mod indaq bis-sustanza kimika tat-test; il-volum standard huwa ta' 0.03 ml.

Jekk possibbli, is-sustanzi kimiċi tat-test solidi għandhom jintahnu f'mehriez u lida, sa ma jkunu kemm jista' jkun fini, jew f'ghodda tat-tħin komparabbli. It-trab jiġi applikat fuq il-kornea b'tali mod li l-kornea tkun miksija b'mod uniformi bis-sustanza kimika tat-test; l-ammont standard huwa ta' 0.03 gm.

Is-sustanza kimika tat-test (likwida jew solida) tiġi applikata għal 10 sekondi u mbagħad titlahh minn fuq l-ghajn bis-salina izotonika (madwar 20 ml) f'temperatura ambjentali. Imbagħad l-ghajn (fl-apparat fejn titqiegħed) terġa' titqiegħed fl-apparat tas-superfużjoni fil-pożizzjoni wieqfa oriġinali. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jsir iktar tlaħliħ wara l-applikazzjoni ta' 10 sek u f'punti ta' zmien sussegwenti (eż. jekk jinstabu residwi ta' sustanza kimika tat-test fuq il-kornea). B'mod ġenerali, l-ammont ta' salina li tintuża b'mod addizzjonali għat-tlaħliħ mhuwiex kritiku, iżda l-osservazzjoni tal-aderenza tas-sustanza kimika mal-kornea hija importanti.

Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

Kontrolli negattivi jew tas-solvent/veikolu paralleli u kontrolli pożittivi għandhom jiġu inklużi f'kull esperiment.

Meta jkunu qegħdin jiġu ttestjati likwidi f'100 % jew solidi, tintuża salina fiżjoloġika bħala l-kontroll negattiv parallel fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'rispons irritanti.

Meta jkunu qegħdin jiġu ttestjati likwidi ddilwiti, fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE jiġi inkluż grupp ta' kontrolli tas-solvent/veikolu parallel sabiex jiġu individwati bidliet mhux speċifiċi fis-sistema tat-test, u sabiex jiġi żgurat li l-kundizzjonijiet tal-assaġġ ma jirriżultawx bla bżonn f'rispons irritanti. Skont il-paragrafu 31, jista' jintuża biss solvent/veikolu li jkun intwera li ma jkollu l-ebda effett avvers fuq is-sistema tat-test.

F'kull esperiment jiġi inkluż irritant għall-ghajnejn magħruf sabiex jiġi vverifikat li jkun gie kkawżat rispons xieraq. Minhabba li l-assaġġ ICE qed jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jidentifika sustanzi kimiċi korrużivi jew irritanti severi, il-kontroll pożittiv għandu jkun sustanza ta' referenza li tikkawża rispons sever f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons sever ma

▼ **M7**

għandux ikun eċċessiv. Għandha tiġi ġġenerata biżżejjed dejta in vitro għall-kontroll pożittiv sabiex għall-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi kkalkolata skala ta' valuri ddefiniti statistikament li tkun aċċettabbli. Jekk ma jkunx hemm disponibbli dejta storika xierqa tal-metodu ta' ttestjar tal-ICE għal kontroll pożittiv partikolari, jista' jkun meħtieġ li jsiru studji li jipprovdu din l-informazzjoni.

Eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi kimiċi tat-test likwidi huma l-aċidu aċetiku 10 % jew il-klorur tal-benzalkonju 5 %, filwaqt li eżempji ta' kontrolli pożittivi għal sustanzi kimiċi tat-test solidi huma l-idrossidu tas-sodju jew l-imidazol.

Is-sustanzi kimiċi ta' riferiment huma utli għall-evalwazzjoni tal-potenzjal li sustanzi kimiċi mhux magħrufa ta' klassi speċifika ta' kimiċi jew tal-prodotti jikkawżaw irritazzjoni okulari, jew għall-evalwazzjoni tal-potenzjal relattiv li sustanza irritanti għall-ġhajnejn tikkawża irritazzjoni okulari fi fteħen skala speċifika ta' risponsi ta' sustanzi irritanti.

Punti ta' Tmiem Imkejlin

Il-korneji trattati jiġu evalwati qabel it-trattament u mbagħad fit-30, fil-75, fil-120, fil-180 u fil-240 minuta ($\pm$ 5 minuti) wara t-tlaħliha ta' wara t-trattament. Dawn il-punti tal-hin jipprovdu għadd xieraq ta' kejl tul il-perjodu tat-trattament ta' erba' sigħat, filwaqt li jhallu biżżejjed hin jgħaddi bejn kejl u iehor sabiex isiru l-osservazzjonijiet neċessarji li għandhom isiru għall-ġhajnejn kollha.

Il-punti ta' tmiem evalwati għall-opaċità, in-nefha, iż-żamma tal-fluworexxeina fil-kornea u l-effetti morfoloġiċi (eż. tħaffir jew illaxkar tal-epitelju). Il-punti ta' tmiem kollha, bl-eċċezzjoni taż-żamma tal-fluworexxeina (li tiġi ddeterminata biss qabel it-trattament u 30 minuta wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test) jiġu ddeterminati f'kull wieħed mill-punti tal-hin imsemmija hawn fuq.

It-tehid ta' ritratti huwa rrakkomandat għad-dokumentazzjoni tal-opaċità, iż-żamma tal-fluworexxeina, l-effetti morfoloġiċi fil-kornea u, jekk issir, l-istopatoloġija.

Wara l-eżami finali wara erba' sigħat, l-utenti huma mhegħin jippreservaw l-ġhajnejn f'fissativ xieraq (eż. formalina bbaferjata newtrali) għal eżami istopatoloġiku possibbli (ara l-paragrafu 14 u r-referenza (8) għal iktar dettalji).

In-nefha fil-kornea tiġi ddeterminata mill-kejl tal-hxuna fil-kornea li jsir permezz ta' pakimetru ottiku fuq mikroskopju korneali. In-nefha tiġi espressa bħala percentwal u tiġi kkalkolata mill-kejl tal-hxuna tal-kornea skont il-formula li ġejja:

$$\left(\frac{\text{corneal thickness at time } t - \text{corneal thickness at time } = 0}{\text{corneal thickness at time } = 0} \right) \times 100$$

Il-percentwal medju tan-nefha fil-kornea għat-testijiet kollha tal-ġhajnejn jiġi kkalkolat għall-punti tal-hin ta' osservazzjoni kollha. Fuq il-bażi tal-ogħla puntegg medju għan-nefha fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-hin, jingħata puntegg tal-kategorija għal kull sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 51).

L-opaċità korneali tiġi evalwata billi tintuża l-iktar parti tal-kornea opaċifikata b'densità għall-punteggar kif muri fit-Tabella 1. Il-valur medju tal-opaċità fil-kornea għat-testijiet kollha tal-ġhajnejn jiġi kkalkolat għall-punti tal-hin ta' osservazzjoni kollha. Fuq il-bażi tal-ogħla puntegg medju għall-opaċità fil-kornea, kif jiġi osservat fi kwalunkwe punt tal-hin, jingħata puntegg tal-kategorija għal kull sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 51).

▼ **M7**

Tabella 1

Punteġġi tal-opaċità tal-kornea.

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda opaċità
0.5	Opaċità hafifa hafna
1	Żoni mifruxin jew diffużi; id-dettalji tal-iris jidhru b'mod ċar
2	Parti trasluċida li tintlemaħ faċilment; id-dettalji tal-iris huma kemxejn oskuri
3	Opaċità severa fil-kornea; ma jidher l-ebda dettall speċifiku tal-iris; id-daqs tal-pupilla bilkemm jintlemaħ
4	Opaċità totali fil-kornea; iris invizibbli

Iż-żamma tal-fluworexxeina tiġi evalwata fil-punt tal-hin ta' osservazzjoni ta' 30 minuta biss kif muri fit-Tabella 2. Il-valur medju taż-żamma tal-fluworexxeina għall-ghajnejn kollha tat-test jiġi kkalkolat għall-punt tal-hin osservat ta' 30 minuta, u jintuza għall-punteġġ kumplessiv tal-kategorija għal kull sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 51).

Tabella 2

Punteġġi taż-żamma tal-fluworexxeina.

Punteġġ	Osservazzjoni
0	L-ebda żamma ta' fluworexxeina
0,5	Tilwin batut hafna ta' ċelloli individwali
1	Tilwin taċ-ċelloli individwali mifrux fil-parti ttrattata kollha tal-kornea
2	Tilwin ta' ċelloli individwali dens fokali jew konfluwenti
3	Partijiet kbar konfluwenti tal-kornea jżommu l-fluworexxeina

Effetti morfoloġiċi inkluż “thaffir” taċ-ċelloli tal-epitelju tal-kornea, “illaxkar” tal-epitelju, “tahrix” tas-superfiċje tal-kornea u “twahhi” tas-sustanza kimika tat-test mal-kornea. Dawn is-sejbiet jistgħu jvarjaw fis-severità u jistgħu isehhu b'mod simultanju. Il-klassifikazzjoni ta' dawn is-sejbiet hija sogġettiva skont l-interpretazzjoni tal-investigatur.

DEJTA U RAPPORTAR**Evalwazzjoni tad-Dejta**

Ir-riżultati tal-opaċità, in-nefha, u ż-żamma tal-fluworexxeina fil-kornea għandhom jiġu evalwati b'mod separat sabiex tinholq klassi separata għal kull punt ta' tmiem. Imbagħad il-klassijiet tal-ICE għal kull punt ta' tmiem jiġu kkombinati sabiex tinholq Klassifikazzjoni tal-Irritazzjoni għal kull sustanza kimika tat-test.

Kriterji tad-Deċiżjoni

Ladarba jkun gie evalwat kull punt ta' tmiem, il-klassijiet tal-ICE jistgħu jiġu assenjati fuq il-bażi ta' skala ta' valuri ddeterminata minn qabel. L-interpretazzjoni tan-nefha tal-kornea (it-Tabella 3), l-opaċità (it-Tabella 4), u ż-żamma tal-fluworexxeina (it-Tabella 5) bl-użu ta' erba' klassijiet tal-ICE ssir skont l-iskali murijin hawn taht. Ta' min jinnota li l-punteġġi tan-nefha tal-kornea murija fit-Tabella 3 huma

▼ **M7**

applikabbli biss jekk il-hxuna titkejjel b'mikroskopju korneali (pereżempju Haag-Streit BP900) b'apparat tal-kejl tal-fond Nru 1 u ssettjar tal-wisgħa tal-ferq ta' $9\frac{1}{2}$, jiġifieri 0,095 mm. L-utenti għandhom ikunu konxji li l-mikroskopji korneali jistgħu jagħtu kejl differenti tal-hxuna tal-kornea jekk l-issettjar tal-wisgħa tal-fetha jkun differenti.

Tabella 3

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għan-nefha tal-kornea.

Nefha Medja tal-Kornea (%) (*)	Klassi tal-ICE
0 sa 5	I
> 5 sa 12	II
> 12 sa 18 (> 75 min wara t-trattament)	II
> 12 sa 18 ($\leq$ 75 min wara t-trattament)	III
> 18 sa 26	III
> 26 sa 32 (> 75 min wara t-trattament)	III
> 26 sa 32 ($\leq$ 75 min wara t-trattament)	IV
> 32	IV

(*) L-ogħla punteġġ medju osservat fi kwalunkwe punt tal-hin

Tabella 4

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għall-opaċità.

Punteġġ Medju Massimu tal-Opaċità (***** *****)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-4,0	IV

(*) Il-punteġġ medju massimu osservat fi kwalunkwe punt tal-hin (fuq il-bażi ta' punteġġi tal-opaċità kif definiti fit-Tabella 1).

Tabella 5

Kriterji tal-klassifikazzjoni tal-ICE għaž-żamma medja tal-fluworexeina.

Punteġġ Medju taž-Żamma tal-Fluworexeina fit-30 minuta ta' wara t-trattament (*)	Klassi tal-ICE
0,0-0,5	I
0,6-1,5	II
1,6-2,5	III
2,6-3,0	IV

(*) Fuq il-bażi tal-punteġġi kif definiti fit-Tabella 2.

Il-klassifikazzjoni *in vitro* għal sustanza kimika tat-test hija vvalutata billi tinqara l-klassifikazzjoni tal-GHS li tikkorrispondi għat-taħlita ta' kategoriji miksuba għal nefha korneali, opaċità korneali, u żamma tal-fluworexeina kif deskritti fit-Tabella 6.

▼ **M7**

Tabella 6

Klassifikazzjonijiet *in vitro* kumplessivi.

Klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU	Tahlitiet tat-3 Punti ta' Tmiem
Ebda Kategorija	3 × I 2 × I, 1 × II
Ma tista' ssir ebda previzjoni	Tahlitiet oħrajn
Kategorija 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Opaċità tal-kornea ≥ 3 fit-30 min (tal-anqas f'2 għajnejn) Opaċità tal-kornea = 4 fi kwalunkwe ħin (tal-anqas f'żewġ (2) għajnejn) Illaxkar sever tal-epitelju (tal-anqas f'għajn wahda)

(*) Tahlitiet inqas probabbli li jsehhu.

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tal-Istudju

Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontrolli negattivi jew tal-veikolu/solvent paralleli u l-kontrolli pożittivi paralleli jiġu identifikati bħala Mhux Ikklassifikati taht il-GHS u tal-Kategorija 1 tal-GHS, rispettivament.

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, jekk tkun rilevanti għat-twettiq tal-istudju:

Sustanza Kimika tat-Test u Sustanzi Kimiċi tal-Kontroll

- Isem tas-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) pereżempju l-isem strutturali użat mill-Chemical Abstracts Service (CAS), segwit minn ismijiet oħrajn, jekk ikunu magħrufin;
- in-Numru tar-Registru (RN) tas-CAS, jekk ikun magħruf;
- Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test / tal-kontroll (f'percentwal(i) skont il-piż), sakemm din l-informazzjoni tkun disponibbli;
- Proprietajiet fizikokimiċi bħall-istat fiziku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, il-klassi kimika, is-solubilità fl-ilma rilevanti għat-twettiq tal-istudju;
- Trattament tas-sustanzi kimiċi tat-test/ta' kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- L-istabilità, jekk tkun magħrufa;

Informazzjoni dwar l-Ispenser u l-Faċilità tat-Test

- L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;
- Identifikazzjoni tas-sors tal-għajnejn (eż. il-faċilità minn fejn ingabru);

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

- Deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata;

▼ **M7**

- Il-mikroskopju korneali użat (eż. mudell) u l-issettjar tal-istrument għall-mikroskopju korneali użat;
- Referenza għal riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv u, jekk applikabbli, dejta storika li turi l-meded aċċettabbli tal-kontroll ta' referenza parallel;
- Il-proċedura użata sabiex tiġi żgurata l-integrità (jiġifieri l-preċiżjoni u l-affidabilità) tal-metodu ta' ttestjar maż-żmien (eż. ittestjar perijodiku tas-sustanzi kimiċi tal-profiċjenza).

Il-Ġbir u l-Preparazzjoni tal-Għajnejn

- L-età u l-piż tal-annimal donatur u, jekk disponibbli, karatteristiċi oħrajn tal-annimali li minnhom ingabru l-għajnejn (eż. sess, razza);
- Il-kundizzjonijiet tat-trasport u l-ħżin tal-għajnejn (eż., id-data u l-ħin meta ngabru l-għajnejn, l-intervall tal-ħin bejn il-ġbir tal-irjus tat-tiġieġ u t-tqegħid tal-għajnejn enukleati f'kavità tas-superfużjoni);
- Il-preparazzjoni u l-immuntar tal-għajnejn, inklużi dikjarazzjonijiet fuq il-kwalità tagħhom, it-temperatura tal-kavitajiet tal-għajnejn, u l-kriterji għall-għażla tal-għajnejn użati għall-ittestjar.

Proċedura tat-test

- In-numru ta' repliki użati;
- L-identità tal-kontrolli negattivi u pożittivi użati (jekk applikabbli, anki solvent u l-kontrolli ta' riferiment);
- Id-doża tas-sustanza kimika tat-test, l-applikazzjoni u l-ħin tal-esponiment użati;
- Il-punti tal-ħin tal-osservazzjoni (qabel u wara t-trattament);
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

- Tabella li tispjega l-punteggi ta' żamma tal-fluworexxeina, l-opacità u n-nefha korneali miksubin għal kull għajn individwali f'kull punt tal-ħin tal-osservazzjoni, inklużi l-punteggi medji f'kull ħin tal-osservazzjoni tal-għajnejn ittestjati kollha;
- L-oġġetiv tal-punteggi ta' nefha tal-kornea, opacità u żamma tal-fluworexxeina osservati (minn kwalunkwe punt tal-ħin), u l-klassi tal-ICE marbutin.
- Deskrizzjoni ta' kull effett ieħor osservat;
- Il-klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU in vitro derivata;
- Jekk xieraq, ritratti tal-għajn;

*Diskussjoni tar-Riżultati**Konklużjoni*

▼ M7

TAGHRIF

- (1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm
- (2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponibbli fuq: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponibbli fuq: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>
- (4) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html
- (5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.
- (6) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, Irritazzjoni/korruzzjoni akuta tal-ghajnejn.
- (7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. *Toxicology In Vitro* 24, 1-9.
- (8) OECD (2011) Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.
- (9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponibbli fuq: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm
- (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- (11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Disponibbli fuq: <http://ecvam-dbalml.jrc.ec.europa.eu/>.
- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
- (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

▼ **M7**

- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- (15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in Vitro* 20,78-81.
- (16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponibbli fuq: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>.
- (17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Preciżjoni: Il-qribija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' "rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika ta' riferiment: Sustanza kimika użata bħala standard għall-paragun ma' sustanza kimika tat-test. Sustanza kimika ta' riferiment għandu jkollha l-proprietajiet li ġejjin; (i), sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii), similarità strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi kimiċi ttestjati; (iii), karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufin; (iv), dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufin; (v), potenza magħrufa fl-iskala tar-rispons mixtieq

Approċċ Minn Isfel Għal Fuq: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li ma tehtieġx klassifikazzjoni għall-irritazzjoni tal-ghajnejn jew hsara serja lill-ghajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li ma jehtigux klassifikazzjoni (eżitu negattiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu pożittiv).

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita.

Kornea: Il-parti trasparenti tal-parti ta' quddiem tal-boċċa tal-ghajn li tiksi l-iris u l-pupilla u thalli d-dawl jghaddi għal gol-parti interna tal-ghajn.

Opacità tal-kornea: Kejl tal-estensjoni tal-opacità tal-kornea wara esponiment għal sustanza kimika tat-test. Żieda fl-opacità tal-kornea hija indikattiva ta' hsara fil-kornea.

Nefha fil-kornea: Kejl oġġettiv fit-test tal-ICE tal-estensjoni tad-distensjoni tal-kornea wara esponiment għas-sustanza kimika tat-test. Din tiġi espressa bħala percentwal u kkalkolata mill-ewwel kejl (qabel id-dożaġġ) tal-hxuna tal-kornea u l-hxuna rreġistrata f'intervalli regolari wara esponiment għas-sustanza kimika tat-test, fit-test tal-ICE. Il-grad tan-nefha tal-kornea huwa indikattiv tal-hsara fil-kornea.

Irritazzjoni tal-ghajnejn: Il-produzzjoni ta' tibdiliet fl-ghajnejn wara l-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test fil-wiċċ anterjuri tal-ghajn, li huma kompletament reversibbli fi zmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti reversibbli fuq l-Ghajnejn" u mal-"Kategorija 2 tal-GHS tan-NU" (4).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Żamma tal-fluwarexxeina: Kejl suġġettiv fit-test tal-ICE ta' kemm is-sodju tal-fluwarexxeina jinżamm miċ-ċelloli tal-epitelju fil-kornea wara l-esponiment għas-sustanza tat-test. L-ammont ta' fluwarexxeina li jinżamm huwa indikattiv tal-hsara fl-epitelju tal-kornea.

Periklu: Proprietà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Effetti irreversibbli fuq l-ghajnejn: ara "Hsara serja lill-ghajnejn" u "Kategorija 1 tal-GHS tan-NU".

▼ **M7**

Tahlita: Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixxux (4)

Kontroll negattiv: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Mhux ikklassifikati: Sustanzi li mhumiex ikklassifikati għal irritazzjoni tal-ghajnejn (Kategorija 2 tal-GHS tan-NU) jew hsara serja lill-ghajnejn (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU). Interkambjabbli ma' "Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU".

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u ttrattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-reazzjoni tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons sever ma għandux ikun eċċessiv.

Affidabilità: Kejljet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuza l-istess protokoll. Tiġi vvalutatata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorju u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Effetti reversibbli fuq l-Ghajnejn: ara "Irritazzjoni tal-ghajnejn" u "Kategorija 2 tal-GHS tan-NU".

Hsara serja lill-ghajnejn: Il-produzzjoni ta' hsara fit-tessut fl-ghajnejn, jew tnaqqis fiziku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wieċ quddiem tal-ghajn, li ma jkunux reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni. Interkambjabbli ma' "Effetti irreversibbli fuq l-ghajnejn" u mal-"Kategorija 1 tal-GHS tan-NU" (4).

Mikroskopju korneali: Strument li jintuza biex l-ghajn tiġi eżaminata b'mod dirett taht l-ingrandiment ta' mikroskopju binokulari billi johloq immaġni dritta u stereoskopika. Fil-metodu ta' ttestjar tal-ICE, dan l-istrument jintuza sabiex wiehed ikun jista' jara l-istrutturi anterjuri ta' ghajn it-tiġieġa kif ukoll biex ikejjel b'mod oggettiv il-hxuna tal-kornea b'apparat li jitwahhal mal-istrument u li jkejjel il-fond.

Kontroll tas-solvent/veikolu: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (4).

Tensjoattiv: Imsejjah ukoll aġent tensjoattiv, dan huwa sustanza, bħal detergent, li tista' tnaqqas it-tensjoni fil-wieċ ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtellja' r-ragħwa jew jippenetra solidi; huwa magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab.

▼ **M7**

Approċċ Minn Fuq Għal Isfel: approċċ sekwenzjali użat għal sustanza kimika ssuspettata li tikkawża ħsara serja lill-ġhajnejn, li jibda bid-determinazzjoni ta' sustanzi kimiċi li jinducu ħsara serja lill-ġhajnejn (eżitu pożittiv) minn sustanzi kimiċi oħrajn (eżitu negattiv).

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita li tkun qiegħda tiġi ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Strategija ta' ttestjar sekwenzjali: Strategija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċizzjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wiehed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun mehtieġ l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-annimali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' periklu fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inklużi min ihaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-haddiema tal-emergenza) u l-ambjent (4).

Kategorija 1 tal-GHS tan-NU: ara “Ħsara serja lill-ġhajnejn” u/jew “Effetti irreversibbli fuq l-ġhajnejn”.

Kategorija 2 tal-GHS tan-NU: ara “Irritazzjoni tal-Ġhajnejn” u/jew “Effetti reversibbli fuq l-ġhajnejn”.

Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU: Sustanzi li ma jissodisfawx ir-rekwiżiti għall-klassifikazzjoni fil-Kategorija 1 jew 2 (2A jew 2B) tal-GHS tan-NU. Interkambjabbli ma' “Mhux ikklassifikati”.

Metodu ta' ttestjar ivvalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar ivvalidat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' preċiżjoni u affidabilità sabiex jitqies aċċettabli għall-ghan propost.

Piż tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konkluzjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza kimika li tkun ta' periklu.

▼ M7

Appendiċi 2

SUSTANZI KIMIĊI TA' PROFIĊJENZA GHALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-ICE

Qabel l-użu ta' rutina ta' metodu ta' ttestjar li jaderixxi ma' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-hsara lill-ghajnejn ta' 13-il sustanza kimika rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħażlu sabiex jirrapprezentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli tal-ghajnejn fuq il-bażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq l-ghajnejn tal-fniek (TG 405) u s-sistema ta' klassifikazzjoni tal-GHS tan-NU (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU) (4)(6). Kriterji tal-ghażla oħrajn kienu li s-sustanzi kimiċi huma disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni, u li hemm dejta ta' kwalità għolja miksuba mill-metodu *in vitro* tal-ICE. Hemm dejta ta' referenza disponibbli fl-SSD (5) u fid-Dokument ta' Revizjoni ta' Sfond tal-ICCVAM għall-metodu ta' ttestjar tal-ICE (9).

Tabella 1

Is-sustanzi kimiċi rakkomandati għall-wiri tal-profiċjenza teknika bl-ICE

Sustanza Kimika	CASRN	Klassi kimika ⁽¹⁾	Forma Fizika	Klassifikazzjoni <i>In Vivo</i> ⁽²⁾	Klassifikazzjoni <i>In Vitro</i> ⁽¹⁾
Klorur tal-benzalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Kloressidin	55-56-1	Ammin, Ammidin	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Aċidu dibenzojl-L-tartariku	2743-38-6	Aċidu karbossiliku, Ester	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Imidazol	288-32-4	Eteroċikliku	Solidu	Kategorija 1	Kategorija 1
Aċidu trikloroacetiku (30 %)	76-03-9	Aċidu Karbossiliku	Likwidu	Kategorija 1	Kategorija 1
2,6-diklorobenz- <i>o</i> -jl klorur	4659-45-4	Aloġenur tal-aċil	Likwidu	Kategorija 2A	Ma tista' ssir ebda previzjoni ⁽²⁾
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melh inorganiku	Solidu	Kategorija 2A ⁽³⁾	Ma tista' ssir ebda previzjoni ⁽²⁾
Etil-2-metilacetato-aċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2 B	Ma tista' ssir ebda previzjoni ⁽²⁾
Sulfossidu tad-dimetil	67-68-5	Kompost tal-kubrit organiku	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda Kategorija
Glicerol	56-81-5	Alkoħol	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda kategorija (fil-limitu)
Metilċiklopentan	96-37-7	Idrokarbur (ċikliku)	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda Kategorija
n-Essan	110-54-3	Idrokarbur (aċikliku)	Likwidu	Ebda Kategorija	Ebda Kategorija

▼ **M7**

Sustanza Kimika	CASRN	Klassi kimika ⁽¹⁾	Forma Fizika	Klassifikazzjoni <i>In Vivo</i> ⁽⁶⁾	Klassifikazzjoni <i>In Vitro</i> ⁽¹⁾
Triacetin	102-76-1	Lipidu	Likwidu	Mhux ikklassifikat	Ebda Kategorija

Taqsiriet: CASRN = Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Klassijiet tas-sustanzi kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza kimika tat-test li tuża skema ta' klassifikazzjoni standard, fuq il-bażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-Librerija Nazzjonali tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi tal-Medicina (MeSH) (disponibbli fuq <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽⁶⁾ Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405) u bl-użu tal-GHS tan-NU (4)(6).

⁽¹⁾ Abbażi tar-riżultati fl-ICE kif deskritti fit-tabella 6.

⁽²⁾ Tahlita tal-punteġġi tal-ICE għajr dawk deskritti fit-tabella 6 għall-identifikazzjoni ta' ebda kategorija tal-GHS u l-Kategorija 1 tal-GHS (ara t-tabella 6)

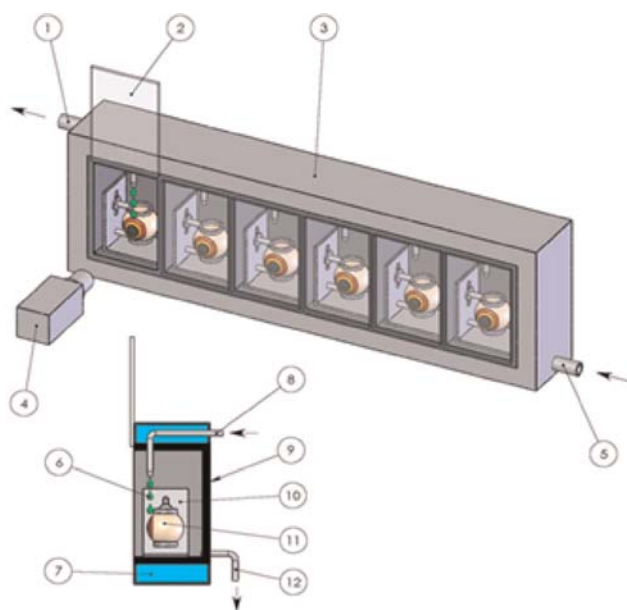
⁽³⁾ Klassifikazzjoni bhala 2A jew 2B tiddependi mill-interpretazzjoni tal-kriterju tal-GHS tan-NU għad-distinzjoni bejn dawn iż-żewġ kategoriji, jiġifieri 1 minn 3 vs 2 minn 3 annimali b'effetti fil-jum 7 neċessarji sabiex tiġi ġġenerata klassifikazzjoni tal-Kategorija 2A. L-istudju *in vivo* kien jinkludi 3 annimali. Il-punti ta' tmiem kollha apparati l-hmura konguntivali f'annimal wiehed irkupraw għal punteġġ ta' zero sal-jum 7 jew qabel. L-annimal li ma rkuprax għalkollox sal-jum 7 kellu punteġġ ta' hmura konguntivali ta' 1 (fil-jum 7) li rkupra għalkollox fil-jum 10.

▼ **M7**

Appendiċi 3

DIJAGRAMMI TAL-APPARAT TAS-SUPERFUŻJONI TAS-SILĠ U L-KLAMPI TAL-GHAJNEJN

(Ara Burton et al. (18) għal deskrizzjonijiet generiċi addizzjonali tal-apparat tas-superfużjoni u l-klampijiet tal-ghajnejn)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Nru tal-Oggett	Deskrizzjoni	Nru tal-Oggett	Deskrizzjoni
1	Ilma shun tal-izbukk	9	Kompartiment
2	Bieb jizzerzaq	10	Apparat fejn titqiegħed l-ghajn
3	Apparat tas-superfużjoni	11	Għajn tat-tigieġa
4	Strument tal-kejl ottiku	12	Soluzzjoni salina tal-izbukk
5	Bokka tal-ilma shun	13	Vit
6	Soluzzjoni salina	14	Lieva ta' fuq aġġustabbli
7	Ilma shun	15	Lieva t'isfel aġġustabbli
8	Soluzzjoni salina tal-bokka		

▼M7

B.49. TEST *IN VITRO* TAL-MIKRONUKLEU TAČ-ĊELLOLI TAL-MAMMIFERI**INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 487 (2016). Huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Għe żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u harsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (1).

It-test *in vitro* tal-mikronukleu (MNvit) hija test tal-ġenotossicità għall-individwazzjoni ta' mikronukleji (MN) fiċ-ċitoplazma ta' ċelloli fl-interfażi. Il-mikronukleji jistgħu jorġinaw minn frammenti ta' kromożomi aċentriċi (jigifieri li ma għandhomx ċentromeru), jew kromożomi shaħ li ma jistgħux jemigraw lejn il-poli waqt l-istadju tal-anafażi tad-diviżjoni taċ-ċelloli. Għaldaqstant, it-test MNvit huwa metodu *in vitro* li jipprovdi bażi komprensiva għall-investigazzjoni ta' potenzjal ta' hsara fil-kromożomi *in vitro* għaliex kemm l-anewġeni kif ukoll il-klastoġeni jistgħu jiġu individwati (2) (3) f'ċelloli li tkun saritilhom diviżjoni taċ-ċelloli matul jew wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 13 għal iktar dettalji). Il-mikronukleji jirrappreżentaw hsara li għet traż-messa lil ċelloli dixxendenti, filwaqt li aberrazzjonijiet tal-kromożomi magħduda fiċ-ċelloli fil-metafażi jistgħu ma jiġux trażmessi. Il-bidliet xorta wahda jistgħu ma jkunux kompatibbli mas-sopravvivenza taċ-ċelloli.

Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti l-użu ta' protokolli bl-inibitur taċ-ċitokalazina B tal-polimerizzazzjoni tal-attina (ċitoB) u mingħajr dan l-inibitur. Iż-żieda taċ-ċitoB qabel il-mitozi tirriżulta f'ċelloli li jkunu binukleati u, għalhekk, tippermetti li jiġu identifikati u analizzati mikronukleji biss f'dawk iċ-ċelloli li jkunu għamlu mitozi wahda (4) (5). Dan il-metodu ta' ttestjar jippermetti wkoll l-użu ta' protokolli mingħajr imblokkatur taċ-ċitokinezi, sakemm ikun hemm evidenza li l-popolazzjoni ta' ċelloli analizzati għaddiet minn mitozi.

Minbarra l-użu tat-test tal-MNvit sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiċi li jinduċu l-mikronukleji, l-użu ta' tikkettar immunokimiku ta' kinetoċori, jew l-ibridizzazzjoni b'sondi ċentromeriċi/telomeriċi (ibridizzazzjoni *in situ* ta' fluworexxenza (FISH)), ukoll jistgħu jipprovdu informazzjoni addizzjonali dwar il-mekkaniżmi ta' hsara fil-kromożomi u tal-formazzjoni ta' mikronukleji (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Dawk il-proċeduri ta' tikkettar u ibridizzazzjoni jistgħu jintużaw meta jkun hemm żieda fil-formazzjoni ta' mikronukleji u l-investigatur ikun jixtieq jiddetermina jekk iż-żieda kinitx ir-riżultat ta' avvenimenti klastoġeniċi u/jew anewġeniċi.

Peress li l-mikronukleji fiċ-ċelloli fl-interfażi jistgħu jiġu vvalutati b'mod relattivament ogġettiv, il-persunal tal-laboratorju jrid jiddetermina biss in-numru ta' ċelloli binukleati meta tintuża ċitoB u l-inċidenza ta' ċelloli mikronukleati fil-kazijiet kollha. Għalhekk, il-lametti jistgħu jiġu kklassifikati relattivament malajr u l-analizi tista' tiġi awtomatizzata. Dan jagħmilha prattika li eluf minflok mijiet ta' ċelloli jiġu kklassifikati f'kull trattament, biex b'hekk tiżdied il-qawwa tat-test. Fl-aħhar nett, minhabba li l-mikronukleji jistgħu jhorgu minn kromożomi tardivi, hemm il-potenzjal li wiehed jindividwa sustanzi li jinduċu anewploidji li huma diffiċli li wiehed jistudjahom f'testijiet konvenzjonali tal-aberrazzjoni kromożomika, eż. il-Kapitolu B.10 ta' dan l-anness (18). Madankollu, it-test MNvit kif deskritt fil-metodu ta' ttestjar ma jippermettix li ssir differenzazzjoni bejn sustanzi kimiċi li jinduċu bidliet fin-numru ta' kromożomi u/jew ploidja minn dawk li jinduċu klastoġeniċità mingħajr tekniki speċjali bħall-FISH imsemmin fil-paragrafu 4.

It-test MNvit huwa b'saħħitu u jista' jsir f'varjetà ta' tipi ta' ċelloli, u fil-preżenza jew fin-nuqqas ta' ċitoB. Hemm dejta estensiva li ssostni l-validità tat-test MNvit bl-użu ta' diversi tipi ta' ċelloli (kulturi ta' linji ta' ċelloli jew kulturi ta' ċelloli primarji) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Dawn jinkludu, b'mod partikolari, l-istudji ta' validazzjoni internazzjonali kkoordinati mis-Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) u r-rapporti tal-Grupp ta' Hidma Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossicità (5) (17). Id-dejta disponibbli għet evalwata mill-ġdid fi

▼ M7

studju ta' validazzjoni retrospettiv skont il-piż tal-evidenza miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM) tal-Kummissjoni Ewropea (KE), u l-metodu tat-test gie approvat bħala xjentifikament validu mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv tal-ECVAM (ESAC) (37) (38) (39).

It-test *in vitro* MNvit taċ-ċelloli tal-mammiferi jista' juża kulturi ta' linji ta' ċelloli jew kulturi ta' ċelloli primarji ta' orijini mill-bniedem jew minn rodituri. Minhabba li l-frekwenza tal-isfond tal-mikronukleji tinfluwenza s-sensittività tat-test, huwa rrakkomandat li jintużaw tipi ta' ċelloli bi frekwenza ta' sfond definita u stabbli ta' formazzjoni ta' mikronukleji. Iċ-ċelloli użati jintgħażlu fuq il-bażi tal-hila li jikbru sew fil-kultura, l-istabilità tal-karjotip (inkluż in-numru ta' kromozomi) u l-frekwenza spontanja ta' mikronukleji (40). Bħalissa, id-dejta disponibbli ma tippermettix li jinħarġu rakkomandazzjonijiet assoluti iżda tissuggerixxi li, meta jiġu evalwati l-perikli kimiċi, huwa importanti li jiġu kkunsidrati l-istatus *p53*, l-istabilità ġenetika (karjotip), il-kapaċità ta' tiswija tad-DNA u l-orijini (minn rodituri jew mill-bniedem) taċ-ċelloli magħżulin għall-ittestjar. Għalhekk, dawk li jużaw dan il-metodu ta' ttestjar huma mheggin jikkunsidraw l-influwenza ta' dawn il-karatteristiċi u karatteristiċi oħrajn taċ-ċelloli fuq il-pres-tazzjoni ta' linja ta' ċelloli fis-sejbien tal-induzzjoni ta' mikronukleji, peress li l-għarfien dejjem qiegħed jiżdied f'dan il-qasam.

Id-definizzjonijiet użati huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

It-testijiet li jsiru *in vitro* generalment jirrekjedu l-użu ta' sors eżoġeniku ta' attivazzjoni metabolika sakemm iċ-ċelloli ma jkunux metabolikament kompetenti fir-rigward tas-sustanzi kimiċi tat-test. Is-sistema eżoġena ta' attivazzjoni metabolika ma timitax għalkollox il-kundizzjonijiet *in vivo*. Wieħed għandu joqgħod attent sabiex jevita kundizzjonijiet li jitsgħu jwasslu għal riżultati pożittivi artefattwali li ma jirriflettux il-ġenotossicità tas-sustanzi kimiċi tat-test. Kundizzjonijiet bħal dawn jinkludu bidliet fil-pH (41) (42) (43) jew l-ożmolalità, interazzjoni mal-medium tal-kultura taċ-ċelloli (44) (45) jew livelli eċċessivi ta' ċitotossicità (ara l-paragrafu 29).

Sabiex wieħed janalizza l-induzzjoni tal-mikronukleji, huwa essenzjali li l-mitozi tkun seħhet kemm fil-kultivazzjonijiet ittrattati kif ukoll f'dawk mhux ittrattati. L-iktar stadju informativ għall-għadd tal-mikronukleji huwa f'ċelloli li temmew mitozi wahda waqt jew wara t-trattament bis-sustanza kimika tat-test. Għal Nanomaterjali Manifatturati, hemm bżonn li jsiru adattamenti speċifiċi ta' dan il-metodu ta' ttestjar li ma jkunux deskritti fih.

Qabel ma jintuza dan il-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiz, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-kulturi ta' ċelloli ta' orijini umana jew minn mammiferi oħrajn huma esposti għas-sustanza kimika tat-test kemm b'sors eżoġenu ta' attivazzjoni metabolika kif ukoll mingħajr dan is-sors sakemm ma jintużawx ċelloli b'kapaċità metabolizzanti adegwata (ara l-paragrafu 19).

Matul jew wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test, iċ-ċelloli jtkabbru għal perjodu twil biżżejjed sabiex il-hsara fil-kromozomi jew effetti oħran fuq iċ-ċiklu taċ-ċellola/id-diviżjoni taċ-ċellola jwasslu għall-formazzjoni ta' mikronukleji fiċ-ċelloli fl-interfażi. Għall-induzzjoni tal-anewploidji, is-sustanza kimika tat-test għandha normalment tkun prezenti waqt il-mitozi. Ċelloli fl-interfażi miġbura u mlewna jiġu analizzati għall-preżenza ta' mikronukleji. Idealment, il-mikronukleji għandhom jingħaddu biss f'dawk iċ-ċelloli li jkunu temmew il-mitozi waqt l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test jew waqt il-perjodu ta' wara t-trattament, jekk jintuza wieħed. F'kulturi li ġew ittrattati b'imblokkatur taċ-ċitokinezi, dan jinkiseb faċilment billi jingħaddu biss iċ-ċelloli binukleati. Fin-nuqqas ta'

▼ M7

mblokkatur taċ-ċitokinezi, importanti li jintwera li ċ-ċelloli analizzati aktarx li jkunu għaddew minn diviżjoni taċ-ċelloli, fuq il-bażi ta' zieda fil-popolazzjoni taċ-ċelloli, matul jew wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test. Għall-protokoll kollha, huwa importanti li jintwera li l-proliferazzjoni taċ-ċelloli seħhet kemm fil-kulturi tal-kontroll kif ukoll f'dawk tat-trattament, u l-grad ta' ċitotossicità jew ċitostazi indotta mis-sustanza kimika tat-test għandu jiġi vvalutat fil-kulturi kollha li jingħaddu għall-mikronukleji.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Ċelloli

Jistgħu jintużaw linfoċiti periferiċi tad-demmi primarji kkulturati mill-bniedem jew mammiferi oħrajn (7) (20) (46) (47) u numru ta' linji ta' ċelloli ta' roditori bħal CHO, V79, CHL/IU, u ċelloli L5178Y jew linji ta' ċelloli tal-bniedem bħat-TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (ara l-paragrafu 6). Linji ta' ċelloli oħrajn bħal HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), ċelloli HepG2 (52) (53), A549 u ċelloli primarji tal-Embriju tal-Hamster Sirjan (54) intużaw għall-ittestjar tal-mikronukleji iżda, għalissa, għadhom ma ġewx invalidati b'mod estensiv. Għaldaqstant, l-użu ta' dawk il-linji u tipi ta' ċelloli għandu jkun iġġustifikat abbażi tal-prestazzjoni tagħhom murija fit-test, kif deskritt fit-taqsimi dwar il-Kriterji ta' Aċċettazzjoni. Gie rrapportat li ċito B għandha l-potenzjal li thalli impatt fuq it-tkabbir taċ-ċelloli L5178Y u, għalhekk, mhijiex irrakkomandata ma' din il-linja ta' ċelloli (23). Meta jintużaw ċelloli primarji, għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' ċelloli ta' oriġini umana meta dan ikun fattibbli u dawn għandhom jiġu kampjunati skont il-prinċipji u r-regolamenti etiċi umani.

Il-linfoċiti periferiċi tad-demmi tal-bniedem għandhom jinkisbu mingħand individwi żgħażaġħ (madwar 18-35 sena) li ma jpejpu u li ma għandhom ebda marda magħrufa jew li ma kinux esposti riċentement għal aġenti ġenotossiċi (eż. sustanzi kimiċi, radjazzjoni jonizzanti) f'livelli li jżidu l-inċidenza ta' sfond ta' ċelloli mikronukleati. Dan jiżgura li l-inċidenza ta' sfond ta' ċelloli mikronukleati tibqa' baxxa u konsistenti. L-inċidenza bażi ta' ċelloli mikronukleati tiżdied mal-età, u din it-tendenza hija iktar evidenti fin-nisa milli fl-irġiel (55). Jekk jingħabru flimkien ċelloli mingħand iktar minn donatur wieħed, għandu jiġi speċifikat l-għadd ta' donaturi. Hemm bżonn li jintwera li ċ-ċelloli nqas sa mill-bidu nett tat-trattament bis-sustanza kimika tat-test sal-kampjunar taċ-ċelloli. Il-kulturi taċ-ċelloli jinzammu f'fazi ta' tkabbir esponenzjali (linji ta' ċelloli) jew jiġu stimolati sabiex jinqasmu (kulturi primarji ta' linfoċiti), sabiex jesponu ċ-ċelloli fi stadji differenti taċ-ċiklu taċ-ċelloli, peress li jaf ma tkunx magħrufa s-sensittività tal-istadji taċ-ċelloli għas-sustanzi kimiċi. Iċ-ċelloli primarji li jehtieġu stimolazzjoni b'aġenti mitoġeniċi sabiex jinqasmu ġeneralment ma jibqgħux sinkronizzati matul l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test (eż. linfoċiti umani wara stimolazzjoni mitoġenika ta' 48 siegħa). L-użu ta' ċelloli sinkronizzati matul it-trattament bis-sustanza kimika tat-test mhuwiex irrakkomandat, iżda jista' jkun aċċettabbli jekk ikun iġġustifikat.

Il-kundizzjonijiet tal-media tal-kultura

Għandhom jintużaw kundizzjonijiet xierqa tal-media tal-kultura u tal-inkubazzjoni (reċipjenti tal-kultura, atmosfera umidifikata ta' 5 % CO₂ jekk xieraq, temperatura ta' inkubazzjoni ta' 37 °C) għaž-żamma tal-kulturi. Il-linji ta' ċelloli għandhom jiġu verifikati b'mod regolari għall-istabilità tal-għadd ta' kromozomi modali u l-assenza ta' kontaminazzjoni tal-Mikoplasma, u ċ-ċelloli ma għandhomx jintużaw jekk ikunu kontaminati jew jekk jinbidel l-għadd ta' kromozomi modali. It-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli tal-linji ta' ċelloli jew il-kulturi primarji użati fil-laboratorju tat-testijiet għandu jkun stabbli u konsistenti mal-karatteristiċi taċ-ċelloli ppubblikati.

▼ **M7****Preparazzjoni tal-kulturi**

Linji ta' ċelloli: iċ-ċelloli huma propagati minn kulturi omm, imqegħdin fil-medium tal-kultura f'densità b'tali mod li ċ-ċelloli f'sospensjonijiet jew f'monosaffi jibqgħu jikbru b'mod esponenzjali sal-hin tal-ġbir (eż. għandha tiġi evitata konfluwenza għal ċelloli li jikbru f'monosaffi).

Linfoċiti: demm shih ittrattat b'antikoagulant (eż. eparina) jew linfoċiti separati jiġu kulturati (eż. għal 48 siegħa għal linfoċiti umani) fil-preżenza ta' mitogenu (eż. fitoemagglutinina (PHA) għal linfoċiti umani) sabiex tiġi indotta diviżjoni taċ-ċelloli qabel l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test u ċitoB.

Attivazzjoni metabolika

Għandhom jintużaw sistemi eżoġeni ta' metabolizzazzjoni meta jintużaw ċelloli b'kapacità metabolika endoġena inadegwata. L-iktar sistema użata spiss li hija l-ewwel rakkomandata, sakemm ma tkunx iġġustifikata sistema oħra, hija frazzjoni postmitokondrijali ssupplimentata minn kofatturi (S9) imhejjija mill-fwied ta' rodituri (generalment firien) ittrattati b'indutturi enzimatiċi bħal Aroclor 1254 (56) (57) jew tahlita ta' fenobarbital u b-naftoflavon (58) (59) (60). Din it-tahlita msemija l-aħħar ma tmurx kontra l-Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes (61) u ntweri li hija effettiva daqs Aroclor 1254 għall-induzzjoni ta' ossidazzjoni b'funzjoni mhallta (58) (59) (60). Il-frazzjoni S9 normalment tintuża f'koncentrazzjonijiet li jvarjaw minn 1 sa 2 % (v/v) iżda tista' tizdied sa 10 % (v/v) fil-medium tat-test finali. L-użu ta' prodotti li jnaqqsu l-indiċi mitotiku, speċjalment prodotti ta' kumplessazzjoni tal-kalcju (62) għandu jiġi evitat matul it-trattament. L-għażla tat-tip u l-koncentrazzjoni ta' sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena jew induttur metaboliku użati tista' tkun influwenzata mill-klassi tas-sustanzi kimiċi li jiġu ttestjati.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jiġu ppreparati f'solventi xierqa u jiġu dilwiti, jekk dan ikun xieraq, qabel it-trattament taċ-ċelloli. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament mas-sistema tat-test u/jew jiġu dilwiti qabel it-trattament tas-sistema tat-test. Is-sustanzi kimiċi gassużi jew volatili tat-test għandhom jiġu ttestjati b'modifiki xierqa fil-protokoll standard, bħat-trattament f'reċipjenti ssiġillati (63) (64) (65). Il-preparamenti tas-sustanza kimika tat-test għandhom isiru eżatt qabel it-trattament, sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-hżin.

Kundizzjonijiet tat-test**Solventi**

Is-solvent għandu jingħażel sabiex tiġi ottimizzata s-solubilità tas-sustanza kimika tat-test mingħajr ma jithalla impatt avvers fuq it-twetliq tal-assaġġ, jiġifieri bidla fit-tkabbir taċ-ċelloli, effett fuq l-integrità tas-sustanza kimika tat-test, reazzjoni ma' reċipjenti tal-kultura, indeboliment tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika. Huwa rakkomandat li, kull meta dan ikun possibbli, l-ewwel għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent milwiem (jew medium tal-kultura). Fost is-solventi ferm stabbiliti hemm l-ilma jew is-sulfossidu tad-dimetil (DMSO). B'mod ġenerali, is-solventi organiċi ma għandhomx jaqbuż l-1 % (v/v). Jekk iċ-ċitoB tiġi dissolta f'DMSO, l-ammont totali ta' solvent organiku użat kemm għas-sustanza kimika

▼ M7

tat-test kif ukoll għaċ-ċitoB ma għandux jaqbez il-1 % (v/v); inkella, għandhom jintużaw kontrolli mhux ittrattati sabiex jiġi żgurat li l-perċentwal ta' solvent organiku ma jkollux effett avvers. Is-solventi milwiema (salina jew ilma) ma għandhomx jaqbz 1-10 % (v/v) fil-medium tat-trattament finali. Jekk jintużaw solventi mhux ferm stabbiliti (eż. etanol jew aċeton), l-użu tagħhom għandu jkun sostnut minn dejta li tindika l-kompatibilità tagħhom mas-sustanza kimika tat-test, is-sistema tat-test u n-nuqqas tagħhom ta' tossiċità ġenetika fil-konċentrazzjoni użata. Fin-nuqqas ta' dik id-dejta ta' sostenn, importanti li jiġu inkluzi kontrolli mhux ittrattati (ara l-Appendiċi 1) kif ukoll kontrolli tas-solvent sabiex jintwera li s-solvent magħżul ma jinduċi ebda effett dannuż jew kromożomiku (eż. aneuploidija jew klastogeniċità).

L-użu ta' ċitoB bħala imblokkatur taċ-ċitokineżi

Wahda mill-aktar kunsiderazzjonijiet importanti fit-twettiq tat-test MNvit hija l-iżgurar li ċ-ċelloli magħduda temmew il-mitozi waqt it-trattament jew il-perjodu ta' inkubazzjoni wara t-trattament, jekk jintuza wiehed. L-għadd tal-mikronukleji, għalhekk, għandu jkun illimitat għal ċelloli li għaddew minn mitozi waqt jew wara t-trattament. ĊitoB hija s-sustanza li ntuzat l-aktar sabiex timblokka ċ-ċitokineżi minhabba li tinibixxi l-għbir tal-attina, u b'hekk tipprevjeni s-separazzjoni taċ-ċelloli dioxendenti wara l-mitozi, li twassal għall-formazzjoni ta' ċelloli binukleati (6) (66) (67). L-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq il-kinetika tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jista' jitkejjel fl-istess hin, jekk tintuza ċitoB. Iċ-ċitoB għandha tintuza bħala imblokkatur taċ-ċitokineżi meta l-linfoċiti tal-bniedem jintużaw minhabba li l-hinijiet taċ-ċikli taċ-ċelloli jkunu varjabbli fost id-donaturi u minhabba li mhux il-linfoċiti kollha jirreaġixxu għall-istimolazzjoni tal-PHA. Iċ-ċitoB mhijiex obligatorja għal tipi ta' ċelloli oħrajn jekk ikun stabbilit li għaddew minn diviżjoni kif deskritta fil-paragrafu 27. Barra minn hekk, ġeneralment iċ-ċitoB ma tintużax meta l-kampjuni jiġu evalwati għal mikronukleji bl-użu ta' metodi ċitometriċi tal-fluss.

Il-konċentrazzjoni xierqa taċ-ċitoB għandha tiġi stabbilita mil-laboratorju għal kull tip ta' ċellola sabiex tinkiseb il-frekwenza ottimali ta' ċelloli binukleati fil-kulturi tal-kontroll tas-solvent u għandu jintwera li din tipproduċi ammont tajjeb ta' ċelloli binukleati għall-ghoti ta' punteġġ. Il-konċentrazzjoni xierqa ta' ċitoB normalment tkun bejn 3 u 6 µg/ml (19).

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossiċità u l-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-trattament

Meta wiehed jistabbilixxi l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, għandhom jiġu evitati konċentrazzjonijiet li għandhom il-kapaċità li jipproduċu rispons pożittiv artefattwali, bħal dawk li jipproduċu ċitotossiċità eċċessiva (ara l-paragrafu 29), il-preċipitazzjoni fil-medium tal-kultura (ara l-paragrafu 30), jew bidliet ċari fil-pH jew ozmolali (ara l-paragrafu 9). Jekk is-sustanza kimika tat-test tikkaguna bidla ċara fil-pH tal-medium fi żmien iż-żgħir, il-pH tista' tiġi aġġustata bl-ibbaferjar tal-medium tat-trattament finali sabiex jiġu evitati riżultati pożittivi artifattwali u sabiex jinżammu l-kundizzjonijiet xierqa tal-kultura.

Il-kejl tal-proliferazzjoni taċ-ċelloli jsiru sabiex ikun żgurat li bizzejjed ċelloli ttrattati jkunu laħqu l-fażi tal-mitozi waqt it-test u li t-trattamenti jsiru fil-livelli xierqa ta' ċitotossiċità (ara l-paragrafu 29). Iċ-ċitotossiċità għandha tiġi stabbilita fl-esperiment ewlieni b'attivazzjoni metabolika u mingħajr bl-użu ta' indikazzjoni xierqa ta' mewt u tkabbir taċ-ċelloli (ara l-paragrafi 26 u 27). Filwaqt li l-evalwazzjoni taċ-ċitotossiċità f'test preliminari inizjali tista' tkun siewja sabiex jiġu definiti ahjar il-konċentrazzjonijiet li se jrin jintużaw fl-esperiment ewlieni, test inizjali mhuwiex obligatorju. Jekk isir, ma għandux isir minflok il-kejl taċ-ċitotossiċità fl-esperiment ewlieni.

It-trattament tal-kulturi b'ċitoB, u l-kejl tal-frekwenzi relattivi ta' ċelloli mononukleati, binukleati jew multinukleati fil-kultura, jipprovdi metodu eżatt tal-kwantifikazzjoni tal-effett fuq il-proliferazzjoni taċ-ċelloli u l-attività ċitotossika jew ċitostatika ta' trattament (6), u jiżgura li ċelloli li nqas waqt jew wara t-trattament biss jingħaddu bil-mikroskopju. L-indiċi tal-proliferazzjoni b'imblokkar taċ-ċitokineżi (CBPI) (6) (27) (68) jew l-Indiċi tar-Replikazzjoni (RI) minn tal-inqas 500 ċellola għal kull kultura (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli) huma rakkomandati sabiex tiġi stmata l-attività ċitotossika u ċitostatika ta' trattament billi

▼ **M7**

jittqabblu l-valuri fil-kulturi tat-trattament u tal-kontroll. Il-valutazzjoni ta' indikaturi ohrajn ta' ċitotossicità (eż. l-integrità taċ-ċelloli, l-apoptożi, in-nekrożi, l-ghadd tal-metafażi, iċ-ċiklu taċ-ċelloli) tista' tkun informazzjoni siewja, iżda ma għandhiex tintuża minflok is-CBPI jew l-RI.

Fi studji minghajr ċitoB, hemm bżonn li jintwera li ċ-ċelloli fil-kultura nqasmu, sabiex sehem sostanzjali taċ-ċelloli magħdudin ikunu ġew diviżi matul jew wara t-trattament bis-sustanza kimika tat-test, inkella jistgħu jiġu prodotti risponsi foloz negattivi. Il-kejl tal-Irduppar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD) jew iż-Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-ċelloli (RICC) huwa rakkomandat sabiex tiġi stmata l-attività ċitotossika u ċitostatika ta' trattament (17) (68) (69) (70) (71) (ara l-Appendiċi 2 għall-formuli). F'hinijiet tal-kampjunar estenzi (eż. trattament għal darba u nofs jew id-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli u għbir wara darba u nofs jew id-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli, li jwasslu għal hinijiet tal-kampjunar itwal minn 3-4 darbiet it-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli b'kollox kif deskritt fil-paragrafi 38 u 39), l-RPD jista' jissottovaluta ċ-ċitotossicità (71). F'dawn iċ-ċirkustanzi, l-RICC tista' tipprovdri kejl aħjar jew inkella l-evalwazzjoni taċ-ċitotossicità wara darba u nofs sad-doppju tat-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli normali tkun stima siewja. Il-valutazzjoni ta' indikaturi ohrajn ta' ċitotossicità jew ċitostażi (eż. l-integrità taċ-ċelloli, l-apoptożi, in-nekrożi, l-ghadd tal-metafażi, l-Indiċi tal-proliferazzjoni (PI), iċ-ċiklu taċ-ċelloli, il-pontijiet nukleoplażmiċi jew l-ghejun nukleari) tista' tkun informazzjoni addizzjonali siewja, iżda ma għandhiex tintuża minflok l-RPD jew l-RICC.

Għandhom jiġu evalwati tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tat-test (mhux inkluzi l-kontroll tas-solvent u pożittivi) li jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettabilità (iċ-ċitotossicità xierqa, in-numru ta' ċelloli, eċċ.). Ikun xi jkun it-tip taċ-ċelloli (linji ta' ċelloli jew kulturi primarji ta' linfoċiti), jistgħu jintużaw kulturi rreplikati jew kulturi uniċi ttrattati f'kull konċentrazzjoni ttestjata. Filwaqt li l-użu ta' kulturi duplikati huwa rakkomandat, kulturi uniċi huma aċċettabbli wkoll diment li jingħata punteġġ lill-istess numru totali ta' ċelloli għal kulturi uniċi jew kulturi duplikati. L-użu ta' kulturi wahedhom huwa ta' rilevanza partikolari meta jiġu vvalutati iktar minn 3 konċentrazzjonijiet (ara l-paragrafi 44-45). Ir-risultati miksubin fil-kulturi rreplikati indipendenti f'konċentrazzjoni partikolari jistgħu jingħabru flimkien għall-analiżi tad-dejta. Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru tossicità baxxa jew ebda tossicità, intervalli tal-konċentrazzjoni ta' madwar id-doppju jew it-tripplu normalment ikunu xierqa. Meta ssehh ċitotossicità, il-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin għandhom ikopru firxa minn dik iċ-ċitotossicità produttiva kif spjegat fil-paragrafu 29 u jinkludu konċentrazzjonijiet li fihom ikun hemm ċitotossicità moderata u baxxa jew ebda ċitotossicità. Hafna sustanzi kimiċi tat-test juru kurvi konċentrazzjoni rispons wiqfin u, sabiex tinkiseb dejta f'ċitotossicità baxxa u moderata jew sabiex tiġi studjata r-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons f'dettall, sejjer ikun hemm bżonn li jintużaw konċentrazzjoni spazjati iktar qrib xulxin u/jew iktar minn tliet konċentrazzjonijiet (kulturi wahedhom jew repliki), speċjalment f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm bżonn li jsir esperiment ripetut (ara l-paragrafu 60).

Jekk il-konċentrazzjoni massima tkun ibbażata fuq iċ-ċitotossicità, l-oghla konċentrazzjoni għandu jkollha l-ghan li tikseb ċitotossicità ta' $55 \pm 5\%$ bl-użu tal-parametri rakkomandati dwar iċ-ċitotossicità (jiġifieri tnaqqis fl-RICC u l-RPD għal linji ta' ċelloli meta ma tintużax ċitoB, u tnaqqis fis-CBPI jew l-RI meta tintuża ċitoB għal $45 \pm 5\%$ tal-kontroll negattiv parallel) (72). Wiehed għandu joqgħod attent meta jinterpreta riżultati pożittivi li mbagħad jistgħu jins-tabu li huma fil-parti superjuri ta' din il-firxa ta' ċitotossicità ta' $55 \pm 5\%$ (71).

▼ M7

Għal sustanzi kimiċi tat-test f'tit li xejn solubbli li mhumie x citotossici f'koncentrazzjonijiet inqas mill-inqas koncentrazzjoni insolubbli, l-ogħla koncentrazzjoni analizzata għandha tipproduċi turbidità jew preċipitat viżibbli bl-għajnejn jew bl-għajna ta' mikroskopju invertit fi tmiem it-test bis-sustanza kimika tat-test. Anki jekk iċ-citotossicità ssehh f'livelli inqas mill-inqas koncentrazzjoni insolubbli, huwa rakkomandat li l-ittestjar isir f'koncentrazzjoni waħda biss li tinduċi turbidità jew bi preċipitat viżibbli għaliex jistgħu jirrizultaw effetti artifattwali mill-preċipitat. Fil-koncentrazzjoni li tipproduċi preċipitat, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li l-preċipitat ma jxekklix it-twertiq tat-test (eż. tilwin jew punteġġar). Id-determinazzjoni tas-solubilità fil-medium tal-kultura qabel l-esperiment tista' tkun utli.

Jekk ma jiġu osservati ebda preċipitat jew citotossicità li tillimita, l-ogħla koncentrazzjoni tat-test għandha tkun tikkorrispondi għal 10 mM, 2 mg/ml jew 2 µl/ml, liema minnhom tkun l-inqas (73) (74) (75). Meta s-sustanza kimika tat-test ma jkollhiex kompożizzjoni definita, eż. sustanza b'kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, il-prodotti ta' reazzjoni kumplessa jew il-materjal bijoloġiku (UVCB) (76), estratt ambjentali eċċ, il-koncentrazzjoni massima jaf trid tkun ogħla (eż. 5 mg/ml), fin-nuqqas ta' citotossicità suffiċjenti, sabiex tiżdied il-koncentrazzjoni ta' kull wiehed mill-komponenti. Madankollu, ta' min jinnota li dawn ir-rekwiżiti jistgħu jvarjaw għall-prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem (93).

Kontrolli

Għal kull hin tal-ġbir għandhom ikunu inkluzi kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 21), li jikkonsistu f'solvent waħdu fil-medium tat-trattament u pproċessat bl-istess mod bħall-kulturi tat-trattament.

Kontrolli pożittivi paralleli huma meħtieġa sabiex juru l-hila tal-laboratorju fl-identifikazzjoni ta' klastoġeni u aneġeni fil-kundizzjonijiet tal-protokoll tat-test użat u l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika eżoġena (meta applikabbli). Fit-tabella 1 ta' hawn taht jingħataw xi eżempji ta' kontrolli pożittivi. Jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv oħrajn, jekk ikunu ġġustifikati.

Fil-preżent, l-ebda aneġen ma huwa magħruf li jeħtieġ attivazzjoni metabolika għall-attività ġenotossika tiegħu (17). Peress li t-testijiet *in vitro* taċċelloli tal-mammiferi huma standardizzati biżżejjed għal trattamenti fuq terminu qasir li jsiru b'mod parallel ma' u mingħajr attivazzjoni metabolika bl-użu tal-istess durata tat-trattament, l-użu tal-kontrolli pożittivi jista' jkun limitat għal klastoġenu li jeħtieġ attivazzjoni metabolika. F'dan il-każ, rispons tal-kontroll pożittiv klastoġeniku wiehed sejjer juri kemm l-attività tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u kemm hija responsiva s-sistema tat-test. Madankollu, trattament fit-tul (mingħajr S9) għandu jkollu l-kontroll pożittiv tiegħu stess peress li d-durata tat-trattament sejjra tvarja mit-test bl-użu tal-attivazzjoni metabolika. Jekk jingħazel klastoġenu bħala l-uniku kontroll pożittiv għal trattament fuq terminu qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajr, għandu jingħazel aneġen għat-trattament fit-tul mingħajr attivazzjoni metabolika. F'ċelloli metabolikament kompetenti li ma jeħtiġux S9, għandhom jintużaw kontrolli pożittivi kemm għall-klastoġenicità kif ukoll għall-aneġenicità.

Kull kontroll pożittiv għandu jintuża f'koncentrazzjoni waħda jew iktar mistennija li toffri zidiet riproduttivi u identifikkabbli fuq l-isfond sabiex tintwera s-sensittività tas-sistema tat-test (jiġifieri l-effetti huma ċari iżda ma jkux minnufih l-identità tal-lametti kodifikati lill-qarrej), u r-rispons ma għandux ikun f'riskju minhabba citotossicità li taqbeż il-limiti speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ **M7****Tabella 1**

Sustanzi kimiċi ta' referenza rakkomandati għall-valutazzjoni tal-profiċjenza tal-laboratorju u għall-għażla tal-kontrolli pożittivi

Kategorija	Sustanza Kimika	CASRN
1. Klastoġeni attivi mingħajr attivazzjoni metabolika		
	Metansulfonat tal-metil	66-27-3
	Mitomiċina C	50-07-7
	4-Nitrokinolina-N-Ossida	56-57-5
	Ċitozina arabinosida	147-94-4
2. Klastoġeni li jeħtieġu attivazzjoni metabolika		
	Benzo(a)piren	50-32-8
	Ċiklofosfamid	50-18-0
3. Anewġeni		
	Kolċisina	64-86-8
	Vinblastina	143-67-9

PROCEDURA**Skeda tat-trattament**

Sabiex tkun massimizzata l-probabbiltà tal-identifikazzjoni ta' anewġenu jew klastoġenu li jaġixxu fi stadju speċifiku fiċ-ċiklu taċ-ċelloli, huwa importanti li għadd suffiċjenti ta' ċelloli li jirrappreżenta d-diversi stadji kollha taċ-ċikli taċ-ċelloli tagħhom jiġu ttrattati bis-sustanza kimika tat-test. It-trattamenti kollha għandhom jibdwu u jintemmu meta ċ-ċelloli jkunu qegħdin jikbru b'mod esponenzjali u ċ-ċelloli għandhom ikompli jikbru sal-hin tal-kampjunar. Għalhekk, l-iskeda tat-trattament għal-linji ta' ċelloli u l-kulturi ta' ċelloli primarji tista' tvarja mhux f'it minn dik tal-linfoċiti li jeħtieġu li l-istimolazzjoni mitogenika tibda ċ-ċiklu taċ-ċelloli tagħhom (17). Għal-linfoċiti, l-iktar approċċ effiċjenti huwa li t-trattament jinbada bis-sustanza kimika tat-test 44-48 siegħa wara l-istimolazzjoni tal-PHA, meta ċ-ċelloli jkunu qegħdin jinqsmu b'mod asinkroniku (6).

Id-dejta ppubblikata (19) tindika li hafna mill-anewġeni u l-klastoġeni sejrjn jinqabdu sa perjodu ta' trattament ta' 3 sa 6 sigħat fil-preżenza u n-nuqqas ta' S9, segwita mit-tnehhija tas-sustanza kimika tat-test u l-kampjunar f'hin ekwivalenti għal madwar darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli wara l-bidu tat-trattament (7).

Madankollu, għal evalwazzjoni dettaljata, li tkun meħtieġa sabiex jiġi konkluż eżitu negattiv, għandhom isiru t-tliet kundizzjonijiet sperimentali kollha kemm huma li ġejjin bl-użu ta' trattament fuq terminu qasir b'attivazzjoni metabolika u mingħajrha u trattament fit-tul mingħajr attivazzjoni metabolika (ara l-paragrafi 56, 57 u 58):

— Ic-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'hin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jinbada t-trattament (19),

— Ic-ċelloli għandhom ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test mingħajr attivazzjoni metabolika għal 3-6 sigħat, u jiġu kampjunati f'hin ekwivalenti għal madwar kull darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jinbada t-trattament (19),

▼ **M7**

- Iċ-ċelloli għandhom ikunu esposti bla heda għas-sustanza kimika tat-test minghajr attivazzjoni metabolika sal-kampjunar f'fin għal madwar kull darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli.

F'każ li xi waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali ta' hawn fuq twassa għal rispons pozittiv, jaf ma jkunx hemm bżonn li jiġi investigat xi wiehed mir-regimi tat-trattament l-oħrajn.

Jekk ikun magħruf jew issuspettat li s-sustanza kimika tat-test taffettwa l-hin taċ-ċikli taċ-ċelloli (eż meta jiġu ttestjati analogi nukleosidiċi), speċjalment għal ċelloli kompetenti p53 (35) (36) (77), il-hinijiet tal-kampjunar jew tal-irkupru jistgħu jiġu estiżi sa darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (jiġifieri total ta' 3 sa 4 darbiet it-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jibdew it-trattamenti fuq terminu qasir u fit-tul). Dawn l-għażliet jindirizzaw is-sitwazzjonijiet li jista' jkun hemm thassib dwarhom fir-rigward tal-interazzjonijiet possibbli bejn is-sustanza kimika tat-test u ċ-ċitoB. Meta jintużaw hinijiet tal-kampjunar estiżi (jiġifieri total ta' 3 sa 4 darbiet iż-żmien tal-kultura tat-tul taċ-ċiklu taċ-ċelloli), wiehed għandu joqgħod attent li jiżgura li ċ-ċelloli jkunu għadhom qegħdin jinqasmod b'mod attiv. Pereżempju, għal linfociti, it-tkabbir esponenzjali jista' jibda jonqos wara 96 siegħa wara l-istimolazzjoni u kulturi monosaffi taċ-ċelloli jistgħu jsiru konfluwenti.

L-iskedi ssuġġeriti għat-trattament taċ-ċelloli huma miġburin fit-Tabella 2. Dawn l-iskedi ta' trattament generali jistgħu jiġu mmodifikati (u għandhom ikunu ġġus-tifikati) skont l-istabilità jew ir-reattività tas-sustanza kimika tat-test jew il-karatteristiċi ta' tkabbir partikolari taċ-ċelloli li jkunu qegħdin jintużaw.

Tabella 2.

It-trattament taċ-ċelloli u l-perjodi tal-ġbir għat-test MNvit

Linfociti, ċelloli primarji u linji ta' ċelloli ttrattati biċ-ċitoB	+ S9 Trattament qasir	Trattament għal 3-6 sigħat fil-preżenza ta' S9; tnehhija tal-S9 u l-medium tat-trattament; zieda ta' medium ġdid u ċitoB; ġbir wara darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jibda t-trattament.
	– S9 Trattament qasir	Trattament għal 3-6 sigħat; tnehhija tal-medium tat-trattament; zieda ta' medium ġdid u ċitoB; ġbir wara darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli mindu jibda t-trattament.
	– S9 Trattament estiż	Trattament għal darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli fil-preżenza taċ-ċitoB; ġbir fi tmiem il-perjodu tat-trattament.

Linji ta' ċelloli ttrattati minghajr ċitoB

(L-istess bhall-iskedi tat-trattament spjegati hawn fuq, bl-eċċezzjoni li ma tiżdied ebda ċitoB)

Għal kulturi monosaffi, iċ-ċelloli mitotiċi (identifikabbli għaliex huma tondi u maqluġhin mill-wiċċ) jistgħu jkunu preżenti fl-aħħar tat-trattament ta' bejn 3 u 6 sigħat. Minhabba li dawn iċ-ċelloli mitotiċi jistgħu jinqalghu faċilment, jistgħu jintilfu meta jitneħħa l-medium li jkun fih is-sustanza kimika tat-test. Jekk hemm evidenza ta' zieda sostanzjali fin-numru ta' ċelloli mitotiċi meta mqabbla mal-kontrolli, xi haġa li tindika inibizzjoni mitotika, iċ-ċelloli għandhom jingabru b'centrifugazzjoni u jiżdiedu lura mal-kulturi, sabiex jiġi evitat milli jintilfu ċelloli li huma f'mitozi, u f'riskju ta' aberrazzjoni kromożomika, f'fin il-ġbir.

▼ M7

Il-ġbir taċ-ċelloli u l-preparazzjoni tal-lametti

Kull kultura għandha tingabar u tiġi pproċessata separatament. Il-preparazzjoni taċ-ċelloli tista' tinvolvi trattament ipotoniku, iżda dan il-pass mhuwiex neċessarju jekk jinkiseb tifrix adegwat taċ-ċelloli b'mod iehor. Jistgħu jintużaw tekniki differenti fil-preparazzjoni tal-lametti sakemm jinkisbu preparazzjonijiet taċ-ċelloli ta' kwalità għolja għall-ġoti tal-punti. Iċ-ċelloli b'membrana taċ-ċelloli intatti u ċitoplazma intatta għandhom jinżammu sabiex ikunu jistgħu jiġu individwati l-mikronukleji u (fil-metodu ta' mblokkar taċ-ċitokineżi) identifikazzjoni affidabbli ta' ċelloli binukleati.

Il-lametti jistgħu jingħataw il-kulur bl-użu ta' metodi varji, bħal Giemsa jew żebgħat speċifiċi fluworexxenti tad-DNA. L-użu ta' żebgħa fluworexxenti xierqa (eż. orangjo tal-akridina (78) jew Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) jista' jelimina xi whud mill-artifatti assoċjati mal-użu ta' tilwin mhux speċifiku għad-DNA. Antikorpi antikinetoċori, FISH b'sondi tad-DNA panċentromeriċi jew tikkettar *in situ* mogħti primer bi primers speċifiċi għall-panċentromeri, flimkien mal-kontrolli xieraq tad-DNA, sabiex jiġi identifikat il-kontenut (kromożomi) shah sejrini jiġu mlewnin filwaqt li frammenti tal-kromożomi aċentriċi (le) ta' mikronukleji jekk l-informazzjoni mekkanistika dwar il-formazzjoni tagħhom tkun ta' interess (16) (17). Jistgħu jintużaw metodi oħrajn għal divrenzjar bejn il-klastoġeni u l-anewġeni jekk ikun intwera li dawn huma effettivi u vvalidati. Pereżempju, għal ċerti linji ta' ċelloli, il-kejliet ta' nukleji sub-2N bħala avvenimenti ipodiplojdi bl-użu ta' tekniki bħall-analiżi tal-immagħnijiet, iċ-ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew ċitometrija tal-fluss jistgħu jipprovdu informazzjoni siewja wkoll (80) (81) (82). L-osservazzjonijiet morfologiċi tan-nukleji jistgħu jagħtu indikazzjonijiet ta' aneuploidija possibbli wkoll. Barra minn hekk, test għal aberrazzjonijiet kromożomiċi fil-metafażi, idealment fl-istess tip ta' ċellola u protokoll b'sensittività komparabbli, jista' jkun siewi wkoll sabiex jiġi stabbilit jekk il-mikronukleji humiex dovuti għal tkissir tal-kromożomi (filwaqt li jkun magħruf li telf ta' kromożomi ma jkunx identifikat fit-test tal-aberrazzjonijiet kromożomiċi).

Analizi

Il-lametti kollha, inkluzi dawk tas-solvent u l-kontrolli mhux ittrattati (jekk użati) u pożittivi, għandhom ikunu kodifikati b'mod indipendenti qabel l-analiżi bil-mikroskopju ta' frekwenzi tal-mikronukleji. Għandhom jintużaw tekniki xierqa sabiex jiġi kkontrollat kwalunkwe preġudizzju jew deriva meta tintuża sistema tal-punteġġ awtomatizzata, pereżempju, ċitometrija tal-fluss, ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew analiżi tal-immagħnijiet. Indipendentement mill-pjattaforma awtomatizzata li tintuża sabiex jiġu nnumerati l-mikronukleji, is-CBPI, l-RI, l-RPD jew l-RICC għandhom jiġu vvalidati b'mod parallel.

F'kulturi ttrattati biċ-ċitoB, il-frekwenzi tal-mikronukleji għandhom jiġu analizzati f'tal-inqas 2 000 ċellola binukleata għal kull konċentrazzjoni u kontroll (83), maqsumin indaqs bejn ir-repliki, jekk jintużaw repliki. Fil-każ ta' kulturi waħedhom għal kull doża (ara l-paragrafu 28), għandhom jingħaddu tal-inqas 2 000 ċellola binukleata għal kull kultura (83) f'din il-kultura waħedha. Jekk għall-ġoti tal-punti f'kull konċentrazzjoni jkun disponibbli sostanzjalment inqas minn 1 000 ċellola binukleata għal kull kultura (għal kulturi duplikati), jew 2 000 (għal kultura singola), u jekk ma tiġi osservata ebda żieda sinifikanti fil-mikronukleji, it-test għandu jiġi ripetut bl-użu ta' aktar ċelloli, jew f'konċentrazzjonijiet inqas ċitotossiċi, skont xi jkun l-aktar xieraq. Wiehed għandu

▼M7

joqgħod attent li ma jgħoddx ċelloli binukleati b'forom irregolari jew meta ż-żewġ nukleji jkunu jvarjaw hafna fid-daqs. Barra minn hekk, iċ-ċelloli binukleati ma għandhomx jiġu jgħalltu ma' ċelloli multinukelati li ma nfirxux wisq. Ċelloli li fihom iktar minn żewġ nukleji ewlenin ma għandhomx jiġu analizzati għal mikronukleji, peress li l-frekwenza tal-mikronukleu bażi tista' tkun oghla f'dawn iċ-ċelloli (84). L-għadd ta' ċelloli mikronukleati huwa aċċettabbli jekk jintwera li s-sustanza kimika tat-test tinterferixxi mal-attività ta' citoB. Test ripetut minghajr CitoB jista' jkun siewi f'dawn il-kazijiet. L-għadd ta' ċelloli mononukleati minbarra iċ-ċelloli binukleati jista' jipprovdni informazzjoni siewja (85) (86), iżda mhuwiex obligatorju.

F'linji ta' ċelloli ttestjati minghajr trattament b'citoB, il-mikronukleji għandhom jingħaddu f'tal-inqas 2 000 ċellola għal kull konċentrazzjoni tat-test u kontroll (83), maqsumin indaqs bejn ir-repliki, jekk jintużaw repliki. Meta jintużaw kulturi waħedhom għal kull konċentrazzjoni (ara l-paragrafu 28), għandhom jingħaddu tal-inqas 2 000 ċellola għal kull kultura f'din il-kultura waħedha. Jekk għall-ghoti tal-punti f'kull konċentrazzjoni jkunu disponibbli sostanzjalment inqas minn 1 000 ċellola għal kull kultura (għal kulturi duplikati), jew 2 000 (għal kultura singola), u jekk ma tiġi osservata ebda zieda sinifikanti fil-mikronukleji, it-test għandu jiġi ripetut bl-użu ta' aktar ċelloli, jew f'konċentrazzjonijiet inqas ċitotossici, skont xi jkun l-aktar xieraq.

Meta tintuża ċ-citoB, għandhom jiġu stabbiliti CBPI jew RI sabiex tiġi vvalutata l-proliferazzjoni taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 2) bl-użu ta' mill-inqas 500 ċellola għal kull kultura. Meta t-trattamenti jitwettqu fin-nuqqas ta' citoB, huwa essenzjali li tiġi pprovduta evidenza li iċ-ċelloli fil-kultura nqas, kif diskuss fil-paragrafi 24-28.

Il-profiċjenza tal-laboratorju

Sabiex tiġi stabbilita biżżejjed esperjenza bl-assaġġ qabel ma jintuża għall-ittestjar ta' rutina, il-laboratorju għandu jkun għamel sensiela ta' esperimenti b'sustanzi kimiċi pożittivi ta' referenza li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmi differenti (tal-inqas waħda b'attivazzjoni metabolika u waħda minghajr, u waħda li taġixxi permezz ta' mekkaniżmu aneġeniku, u magħżula mis-sustanzi kimiċi elenkati fit-Tabella 1) u bosta kontrolli negattivi (inkluzi kulturi mhux ittrattati u bosta solventi/veikoli). Dawn ir-risponsi tal-kontrolli pożittivi u negattivi reazzjonijiet għandhom ikunu konsistenti mat-tagħrif. Dan mhuwiex applikabbli għal laboratorju li għandhom esperjenza, jiġifieri li għandhom database storika disponibbli kif definita fil-paragrafi 49 sa 52.

Għandha tiġi investigata firxa ta' sustanzi kimiċi tal-kontrolli pożittivi (ara t-Tabella 1) bi trattamenti qosra u twal fin-nuqqas ta' attivazzjoni metabolika, u anki bi trattamenti qasir fil-preżenza ta' attivazzjoni metabolika, sabiex tintwera l-hila li jinqabdu sustanzi kimiċi klastoġeniċi u aneġeniċi u tiġi stabbilita l-effikaċja tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika u jintwera li l-proċeduri tal-għadd huma xierqa (l-analiżi viżwali bil-mikroskopju, iċ-ċitometrija tal-fluss, iċ-ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew l-analiżi tal-immagnijiet). Għandha tingħażel medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi magħżulin sabiex jingħataw zidiet riproduttivi u marbutin mal-konċentrazzjoni fuq l-isfond sabiex jintwerew is-sensittività u l-firxa dinamika tas-sistema tat-test.

Dejta storika tal-kontroll

Il-laboratorju għandu jistabbilixxi:

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontrolli pożittivi,

— Medda u distribuzzjoni storiċi tal-kontrolli negattivi (mhux ittrattati, solvent).

Meta għall-ewwel tinkiseb id-dejta għal distribuzzjoni storika tal-kontrolli negattivi, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu konsistenti mad-dejta tal-kontrolli negattivi ippubblikata, meta tkun teżisti. Peress li tiżied iktar dejta sperimentali mad-distribuzzjoni tal-kontrolli, idealment il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % ta' dik id-distribuzzjoni (87) (88). Id-database storika tal-kontrolli negattivi tal-laboratorju għall-ewwel għandha tinbena b'minimu ta' 10 esperimenti iżda idealment tkun tikkonsisti f'tal-inqas 20 esperimenti imwettqin f'kundizzjonijiet sperimentali paragonabbli. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew X-bar charts (88)), sabiex jidentifikaw kemm hija

▼ **M7**

varjabbli d-dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv tagħhom, u sabiex juru li l-metodologija hija “taht kontroll” fil-laboratorju tagħhom (83). Rakkomandazzjonijiet ulterjuri dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inkluzjoni u l-eskluzjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabilità għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (87).

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tad-dejta mad-databases tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll.

Id-dejta tal-kontroll negattiv għandha tikkonsisti fl-inċidenza taċ-ċelloli mikronukleati minn kultura waħedha jew is-somma tal-kulturi ta' replika kif deskritti fil-paragrafu 28. Idealment, il-kontrolli negattivi paralleli għandhom ikunu fi hdan il-limiti ta' kontroll ta' 95 % tad-distribuzzjoni storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju (87) (88). Meta d-dejta tal-kontroll negattiv parallel tohog mil-limiti ta' kontroll ta' 95 %, din tista' titqies aċċettabbli li tiddaħhal fid-distribuzzjoni storika tal-kontroll diment li din id-dejta ma tkunx eċċezzjoni estrema u jkun hemm evidenza li s-sistema tat-test tkun “taht kontroll” (ara l-paragrafu 50) u hemm evidenza ta' nuqqas ta' żball tekniku jew uman.

DEJTA U RAPPORTAR**Preżentazzjoni tar-riżultati**

Jekk tintuza t-teknika ta' mblokkar taċ-ċitokinezi, huma biss il-frekwenzi taċ-ċelloli binukleati b'mikronukleji (indipendenti mill-ghadd ta' mikronukleji għal kull ċellola) li għandhom jintużaw fl-evalwazzjoni tal-induzzjoni tal-mikronukleji. L-ghadd tan-numri ta' ċelloli b'mikronukleu wiehed, tnejn jew iktar jista' jiġi rrapportat għalih u jista' jipprovdi informazzjoni siewja, iżda mhuwiex obligatorju.

Għandhom jiġu stabbiliti miżuri simultani ta' ċitotossicità u/jew ċitostazi għall-kulturi ttrattati, tal-kontroll pożittiv u negattiv kollha (16). Is-CBPI jew l-RI għandhom jiġu kkalkolati għall-kulturi kollha ttrattati u ta' kontroll bħala kejl tad-dewmien taċ-ċiklu taċ-ċelloli meta jintuza l-metodu ta' mblokkar taċ-ċitokinezi. Fin-nuqqas ta' ċitoB, għandhom jintużaw l-RPD jew l-RICC (ara l-Appendiċi 2).

Għandha tiġi pprovduta dejta dwar il-kultura individwali. Barra minn hekk, id-dejta kollha għandha tingabar taht forma ta' tabella.

Kriterji ta' Aċċettabilità

L-aċċettazzjoni ta' test hija bbazata fuq il-kriterji li ġejjin:

- Il-kontroll negattiv parallel jitqies aċċettabbli għaž-żieda fid-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 50.
- Il-kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 50) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' dawk iġġenerati fid-database storika tal-kontroll pożittiv tal-laboratorju u jipproduċu zieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontroll negattiv parallel.
- Il-kriterji ta' proliferazzjoni taċ-ċelloli fil-kontroll tas-solventi għandhom ikunu ssodisfati (paragrafi 25-27).
- Il-kundizzjonijiet sperimentali kollha ġew ittestjati sakemm wiehed ma rriżultax friżultati pożittivi (il-paragrafi 36-40).
- Hemm numru adegwat ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet li huma analizzabbli (paragrafi 28 u -46).

▼ **M7**

- Il-kriterji għall-ghazla tal-oghla konċentrazzjoni huma konsistenti ma' daww deskritti fil-paragrafi 24-31.

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk, fi kwalunkwe waħda mill-kundizzjonijiet sperimentali analizzati (ara l-paragrafi 36-39):

- tal-inqas waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel (89)
- żieda hija marbuta mad-doża f'tal-inqas kundizzjoni sperimentali waħda meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi (ara l-paragrafu 28)
- kwalunkwe wieħed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 52).

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi tkissir tal-kromożomi u/jew gwadann jew telf f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mit-tagħrif (90) (91) (92).

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk, fil-kundizzjonijiet sperimentali analizzati kollha (ara l-paragrafi 36-39):

- l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll negattiv parallel,
- ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontroll negattiv (eż. limiti tal-kontroll ta' 95 % ibbażati fuq Poisson; ara l-paragrafu 52).

Is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi tkissir tal-kromożomi u/jew gwadann jew telf f'din is-sistema tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-iktar metodi statistiċi xierqa jistgħu jinkisbu wkoll mit-tagħrif (90) (91) (92).

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

F'każ li r-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar kif spjegat hawn fuq u/jew sabiex tghin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-dejta għandha tiġi evalwata b'gudizzju espert u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri. L-ikklassifikar ta' ċelloli addizzjonali (fejn xieraq) jew it-tweġġ ta' esperiment ripetut possibilmint bl-użu ta' kundizzjonijiet modifikati tal-esperiment (eż. spazjar tal-konċentrazzjonijiet, kundizzjonijiet ta' attivazzjoni metabolika oħrajn [jiġifieri konċentrazzjoni S9 jew oriġini S9]) jista' jkun siewi.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' dejta mhuwiex sejjer jippermetti li tinhareġ konkluzjoni pożittiva jew negattiva u, għalhekk, sejjer jiġi konkluz bħala ekwivoku.

Sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu mikronukleji fit-test MNvit jistgħu jagħmlu dan minhabba li jinduċu ksur tal-kromożomi, telf tal-kromożomi jew tahlita tat-tnejn. Jistgħu jintużaw analiżi ulterjuri li tuża antikorpi antikinetokorru, sondi *in situ* speċifiċi għaċ-ċentromeri, jew metodi oħrajn sabiex jiġi stabbilit jekk il-mekkanizmu ta' induzzjoni tal-mikronukleji huwiex dovut għal attività klastogenika u/jew aneugenika.

▼ M7**Rapport tat-test**

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

Sustanza kimika tat-test:

- is-sors, in-numru tal-lott, id-data ta' limitu għall-użu, jekk disponibbli;
- l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test stess, jekk maghrufa;
- ir-reattività tas-sustanzi kimiċi tat-test mas-solvent/mezz jew il-media tal-kultura taċ-ċelloli;
- is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent, jekk maghrufin;
- il-kejl tal-pH, l-ożmolarità u l-preċipitat fil-medium tal-kultura li miegħu żdiedet is-sustanza kimika tat-test, kif xieraq.

Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

- iktar karatterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solventi:

- ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent;
- il-perċentwal ta' solvent fil-medium tal-kultura finali

Ċelloli:

- it-tip u s-sors taċ-ċelloli użati;
- l-adattabilità tat-tip ta' ċelloli użati;
- in-nuqqas ta' mikoplasma, fil-każ ta' linji ta' ċelloli;
- għal-linji ta' ċelloli, informazzjoni dwar it-tul taċ-ċiklu taċ-ċellola jew l-indiċi tal-proliferazzjoni;
- meta jintużaw linfoċiti, is-sess tad-donaturi tad-demem, l-età u kwalunkwe informazzjoni rilevanti dwar id-donatur, id-demem shih jew il-linjoċiti separati, il-mitoġenu użat;
- iż-żmien normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli (kontroll negattiv);
- in-numru ta' passagġi, jekk disponibbli, għal-linji ta' ċelloli;
- il-metodi għall-manutenzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli, għal-linji ta' ċelloli;
- in-numru modali ta' kromożomi, għal-linji ta' ċelloli.

▼ M7*Kundizzjonijiet tat-test:*

- l-identità tas-sustanza li timblokka ċ-ċitokineżi (eż. citoB), jekk tintuża, u l-konċentrazzjoni tagħha, flimkien mad-durata tal-esponiment taċ-ċelloli;
- il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test espressa bħala konċentrazzjoni finali fil-medium tal-kultura (eż. µg jew mg/mL jew mM tal-medium tal-kultura);
- ir-raġuni għall-ghażla tal-konċentrazzjonijiet u l-ghadd ta' kulturi, inkluża dejta dwar iċ-ċitotossicità u l-limitazzjonijiet tas-solubilità;
- il-kompożizzjoni tal-media, il-konċentrazzjoni tas-CO₂ jekk applikabbli, il-livell ta' umdità;
- il-konċentrazzjoni (u/jew il-volum) tas-solvent u s-sustanza kimika tat-test miżjuda fil-medium tal-kultura;
- it-temperatura u l-hin tal-inkubazzjoni;
- id-durata tat-trattament;
- il-hin tal-ġbir wara t-trattament;
- id-densità taċ-ċelloli waqt l-injettar, jekk applikabbli;
- it-tip u l-kompożizzjoni tas-sistema ta' attivazzjoni metabolika (is-sors ta' S9, il-metodu ta' preparazzjoni tat-tahlita ta' S9, il-konċentrazzjoni jew il-volum ta' tahlita ta' S9 u l-S9 fil-medium tal-kultura finali, il-kontrolli tal-kwalità tal-S9 (eż. l-attività enzimatika, l-isterilità, il-kapaċità metabolika);
- is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u negattiv, il-konċentrazzjonijiet finali, il-kundizzjonijiet u d-durati tat-trattament u l-perjodi ta' rkupru;
- il-metodi tal-preparazzjoni tal-lametti u t-teknika użata għat-tilwin;
- il-kriterji għall-ghadd taċ-ċelloli mikronukelati (għażla taċ-ċelloli analizzabbli u l-identifikazzjoni tal-mikronukleu);
- l-ghadd ta' ċelloli analizzati;
- il-metodi għall-kejl taċ-ċitotossicità;
- kwalunkwe informazzjoni supplimentari rilevanti għaċ-ċitotossicità u l-metodu użat;
- il-kriterji biex l-istudji jitqiesu bħala pożittivi, negattivi jew ekwivoċi;
- il-metodu/i tal-analiżi statistika użat(i);
- il-metodi, bħall-użu ta' antikorp antikinetoċoru jew sondi speċifiċi panċentro-meriċi, sabiex jiġi kkaratteriztat jekk mikronukleu fihx kromozomi shaħ jew frammentati, jekk applikabbli;
- il-metodi użati sabiex jiġu stabbiliti l-pH, l-ożmolalità u l-preċipitazzjoni.

Ir-riżultati:

- definizzjoni taċ-ċelloli aċċettabbli għall-analiżi;
- fin-nuqqas ta' citoB, l-ghadd ta' ċelloli ttrattati u l-ghadd ta' ċelloli migburin għal kull kultura fil-każ tal-linji ta' ċelloli;

▼ **M7**

- il-kejl tač-ċitotossicità użat, eż. CBPI jew RI fil-każ ta' metodu ta' mblokkar tač-ċitokineżi; RICC jew RPD meta ma jintużawx metodi ta' mblokkar tač-ċitokineżi; osservazzjonijiet oħrajn jekk jeżistu (eż. konfluwenza tač-ċelloli, apoptożi, nekrożi, għadd tal-metafażi, frekwenza ta' ċelloli binukleati);
- is-sinjali ta' preċipitazzjoni u l-ħin tad-determinazzjoni;
- dejta dwar il-pH u l-ożmolalità tal-medium tat-trattament, jekk ikun stabbilit;
- id-distribuzzjoni tač-ċelloli mononukleati, binukleati u multinukleati jekk jintuża l-metodu ta' mblokkar tač-ċitokineżi;
- l-għadd ta' ċelloli b'mikronukleji mogħtija separatament għal kull kultura tat-trattament u tal-kontroll, u jekk hux minn ċelloli binukleati jew mononukleati, fejn xieraq,
- ir-relazzjoni konċentrazzjoni rispons, fejn possibbli,
- id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv (konċentrazzjonijiet u solventi) parallel;
- id-dejta tal-kontroll negattiv (solvent) u pożittiv, b'meded, medji u devjazzjonijiet standard u limiti ta' kontroll ta' 95 % għad-distribuzzjoni, kif ukoll in-numru ta' dejta;
- analiżi statistika; il-valuri p, jekk ikun hemm.

Diskussjoni tar-riżultati.

Konkluzjonijiet.

TAGHRIF

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.
- (5) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼ M7

- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.
- (10) Miller, B.M. *et al.* (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.
- (12) Migliore, L. *et al.* (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by anti-kinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. *et al.* (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.
- (16) Zijno, P. *et al.* (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 211-219.
- (17) Kirsch-Volders *et al.* (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.
- (18) Il-Kapitolu 10 ta' dan l-Annes: *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*.
- (19) Lorge, E. *et al.* (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.
- (20) Clare, G. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.
- (22) Wakata, A. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.
- (23) Oliver, J. *et al.* (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.
- (24) Albertini, S. *et al.* (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- (25) Miller, B. *et al.* (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼ **M7**

- (26) Miller, B. *et al.* (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.
- (27) Kalweit, S. *et al.* (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.
- (28) Kersten, B. *et al.* (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.
- (29) von der Hude, W. *et al.* (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- (31) Matsushima, T. *et al.* (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.
- (34) Hashimoto K. *et al.* (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. *et al.* (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- (37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. Il-25 laqgha tal-ESAC, 16-17 ta' Novembru 2006, Disponibbli fuq: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponibbli fuq: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. *et al.* (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis*, Vol 23/4, pp. 271-283.
- (40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.

▼ **M7**

- (41) Scott, D. *et al.* (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.
- (42) Morita, T. *et al.* (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (44) Long, L.H. *et al.* (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (45) Nesslany, F. *et al.* (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.
- (48) Payne, C.M. *et al.* (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.
- (49) Bazin, E. *et al.* (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. *et al.* (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.
- (51) Josse, R. *et al.* (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. *et al.* (2002). Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. *et al.* (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge. *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- (54) Gibson, D.P. *et al.* (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.
- (55) Bonassi, S. *et al.* (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (57) Ong, T.-m. *et al.* (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼ M7

- (58) Elliott, B.M. *et al.* (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.
- (59) Matsushima, T. *et al.* (1976). (1976), “A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems”, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al.* (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28, pp. 51-59.
- (61) UNEP (2001). Konvenzjoni ta' Stokkolma dwar Materjal Organiku Persistenti li Jniġġes, Programm tan-Nazzjonijiet Uniti għall-Ambjent (UNEP). Disponibbli fuq: <http://www.pops.int/>
- (62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.
- (63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). “CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids”, in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (64) Zamora, P.O. *et al.* (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (65) Asakura, M. *et al.* (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2004). Corrigendum to “Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”. *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) Lorge, E. *et al.* (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (70) Surrallés, J. *et al.* (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.
- (72) Pfuhler, S. *et al.* (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.
- (73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Disponibbli fuq talba.

▼M7

- (74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.
- (75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.
- (76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (77) Sobol, Z. *et al.* (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. *et al.* (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280–286.
- (81) Nicolette, J. *et al.* (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.
- (83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.
- (84) Fenech, M. *et al.* (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. *et al.* (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.
- (87) Hayashi, M. *et al.* (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). “*In vitro* micronucleus test”, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (91) Galloway, S.M. *et al.* (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼ M7

- (92) Richardson, C. *et al.* (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Anewġenu: kwalunkwe sustanza kimika jew proċess li, meta jinteraġġixxu mal-komponenti tal-apparat taċ-ċiklu tad-diviżjoni taċ-ċellola mitotika u mejotika, iwasslu għal aneuploidija f'ċelloli jew organiżmi.

Aneuploidija: kwalunkwe devjazzjoni mill-ġhadd ta' diploidji (jew aploidji) normali ta' kromożomi minn kromożomu wiehed jew aktar, iżda mhux mis-sett(ijiet) kollu/kollha ta' kromożomi (poliploidija).

Apoptożi: mewta programmata taċ-ċelloli kkaratterizzata minn sensiela ta' passi li jwasslu għad-diżintegrazzjoni taċ-ċelloli fil-partikoli mwahhlin mal-membrana li mbagħad jiġu eliminati permezz ta' fagoċitożi jew permezz ta' tixrid.

Proliferazzjoni taċ-ċelloli: iż-żieda fl-ġhadd ta' ċelloli bħala riżultat ta' diviżjoni mitotika taċ-ċelloli.

Ċentromeru: ir-reġjun tad-DNA ta' kromożomu wiehed fejn iż-żewġ kromatidi jinżammu flimkien u li fuqu hemm imwahhlin ġenb ma' ġenb iż-żewġ kinetokori.

Sustanza kimika: sustanza jew tahlita.

Konċentrazzjonijiet: tirreferi għal konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tal-kultura.

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

Ċitokinezi: il-proċess ta' diviżjoni taċ-ċelloli minnufih wara mitozi sabiex jiffirma żewġ ċelloli żgħar, fejn kull waħda jkun fiha nukleu wiehed.

Indiċi tal-Proliferazzjoni b'Imblokkar taċ-Ċitokinezi (CBPI): il-proporzjon ta' ċelloli tat-tieni diviżjoni fil-popolazzjoni ttrattata meta mqabbla mal-kontroll mhux ittrattat (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitostazi: inibizzjoni tat-tkabbir taċ-ċelloli (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Ċitotossicità: Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar li jsiru fil-preżenza ta' ċitokalazina B, iċ-ċitotossicità tiġi identifikata bħala tnaqqis fl-indiċi tal-proliferazzjoni b'imblokkatur taċ-ċitokinezi (CBPI) jew l-Indiċi tar-Replikazzjoni (RI) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabbla mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 26 u l-Appendiċi 2)

Għall-assaġġi koperti f'dan il-metodu ta' ttestjar imwettqin fin-nuqqas ta' ċitokalazina B, iċ-ċitotossicità hija identifikata bħala tnaqqis fl-irduppar relattiv tal-popolazzjoni (RPD) jew iż-żieda relattiva fl-ġhadd taċ-ċelloli (RICC) taċ-ċelloli ttrattati meta mqabblin mal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 27 u l-Appendiċi 2).

Ġenotossiċi: terminu ġenerali li jkopri t-tipi kollha hsara lid-DNA jew lill-kromożomi, inkluzi ksur, tħassiriet, addotti, modifiki u konnessjonijiet tan-nukleotidi, riarrangamenti, mutazzjonijiet tal-ġeni, aberrazzjonijiet kromożomiċi, u aneuploidija. Mhux it-tipi kollha ta' effetti ġenotossiċi jirriżultaw f'mutazzjonijiet jew hsara fil-kromożomi stabbli.

Ċelloli fl-interfażi: ċelloli li mhumiex fl-istadju mitotiku.

Kinetoċoru: struttura li fiha l-proteina li tgħaqquad fiċ-ċentromeru ta' kromożoma li magħha jaqbd u l-fibri rqaq matul id-diviżjoni taċ-ċelloli, sabiex b'hekk ikun hemm il-moviment ordnat ta' kromożomi dioxendenti għall-poli taċ-ċelloli dioxendenti.

▼ **M7**

Mikronukleji: nukleji żġhar, separati minn u addizzjonali għan-nukleji ewlenin ta' ċelloli, prodotti waqt it-telofażi ta' mitożi jew mejożi permezz frammenti ta' kromożomi li jibqa' jew kromożomi shah.

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

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

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

Nondisġunzjoni: nuqqas min-naha tal-kromatidi f'pari milli jinfirdu u jissegregaw ruħhom sew sabiex jiżviluppaw ċelloli dioxendenti, u dan jirriżulta f'ċelloli żġhar b'għadd anormali ta' kromożomi.

Status p53: il-proteina p53 hija involuta fir-regolamentazzjoni taċ-ċiklu taċ-ċelloli, l-apoptożi u t-tiswija tad-DNA. Ċelloli b'defiċjenza fil-proteina p53 funzjonali, li mhux kapaċi jinibixxu ċ-ċiklu taċ-ċelloli jew jelimintaw iċ-ċelloli bil-ħsara b'apoptożi jew mekkanizmi oħrajn (eż. induzzjoni tat-tiswija tad-DNA) marbutin mal-funzjonijiet p53 frispons għall-ħsara fid-DNA, teoretikament għandhom ikunu iktar suxxettibbli għal mutazzjonijiet tal-ġeni jew aberrazzjonijiet kromożomiċi.

Poliploidija: aberrazzjonijiet kromożomiċi numeriċi f'ċelloli jew organiżmi li jinvolvu sett(ijiet) shih(shah) ta' kromożomi, meta mqabbla ma' kromożoma individwali jew kromożomi (anewploidija).

Indiċi tal-Proliferazzjoni (PI): metodu għall-kejl taċ-ċitotossicità meta ma tintużax iċ-ċitoB (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Żieda Relattiva fl-Għadd taċ-Ċelloli (RICC): metodu għall-kejl taċ-ċitotossicità meta ma tintużax iċ-ċitoB (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Irduppar Relattiv tal-Popolazzjoni (RPD): metodu għall-kejl taċ-ċitotossicità meta ma tintużax iċ-ċitoB (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

Indiċi tar-Replikazzjoni (RI): il-proporzjon taċ-ċikli tad-diviżjoni taċ-ċelloli mwettqa f'kultura ttrattata, fir-rigward tal-kontroll mhux trattat, matul il-perjodu ta' esponiment u l-irkupru (ara l-Appendiċi 2 għall-formula).

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

Tahlita ta' F9: tahlita tal-frazzjoni tal-fwied S9 u l-kofatturi neċessarji għall-attività tal-enzimi metabolici.

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

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

Kontroll mhux ittrattat: kulturi li ma jirċievu ebda trattament (jiġifieri ebda sustanza kimika tat-test u lanqas solvent) izda jiġu pproċessati fl-istess hin bl-istess mod bħall-kulturi li jirċievu s-sustanza kimika tat-test.

▼ **M7***Appendiċi 2***FORMOLI GHALL-VALUTAZZJONI TAČ-ĊITOTOSSIČITÀ**

Meta tintuża ċ-ċitoB, l-evalwazzjoni tač-ċitotossičità għandha tkun ibbażata fuq l-**Indiċi tal-Profilerrazzjoni b'Imblokkar tač-Ċitokinezi (CBPI)** jew l-**Indiċi tar-Replikazzjoni (RI)** (17) (69). Is-CBPI tindika l-għadd medju ta' nukleji għal kull ċellola, u tista' tintuża sabiex tiġi kkalkolata l-proliferazzjoni tač-ċelloli. L-RI tindika l-għadd relattiv ta' ċikli tač-ċelloli għal kull ċellola matul il-perjodu ta' esponiment għač-ċitoB f'kulturi ttrattati meta mqabblin ma' kulturi tal-kontroll u tista' tintuża sabiex jiġi kkalkolat il- % ta' ċitostazi:

$$\% \text{ Cytostasis} = 100 - 100 \{ (\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1) \}$$

Kif ukoll:

T = kultura tat-trattament bis-sustanza kimika tat-test

C = kultura tal-kontroll

Fejn:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{No. mononucleate cells}) + (2 \times \text{No. binucleate cells}) + (3 \times \text{No. multinucleate cells}))}{(\text{Total number of cells})}$$

Għaldaqstant, CBPI ta' 1 (iċ-ċelloli kollha huma mononukleati) hija ekwivalenti għal ċitostazi ta' 100 %.

Ċitostazi = 100-RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No. multinucleate cells})) / (\text{Total number of cells})_T}{((\text{No. binucleate cells}) + (2 \times \text{No. multinucleate cells})) / (\text{Total number of cells})_C} \times 100$$

T = kulturi ttrattati

C = kulturi tal-kontroll

B'hekk, RI ta' 53 % ifisser li, meta mqabbel mal-għadd ta' ċelloli li jkunu nqasmu biex jiffurmaw ċelloli binukleati u multinukleati fil-kultura ta' kontroll, 53 % biss ta' dan l-għadd ġew diviżi fil-kultura trattata, jiġifieri ċitostazi ta' 47 %.

Meta ma tintużax ċitoB, hija rrakkomandata evalwazzjoni tač-ċitotossičità fuq il-bażi taż-**Zieda Relattiva fl-Għadd tač-Ċelloli (RICC)** jew fuq l-**Irduppjar tal-Popolazzjoni Relattiva (RPD)** (69), minhabba li t-tnejn iqisu l-proporzjon tal-popolazzjoni tač-ċelloli li tkun inqasmet.

$$\text{RICC}(\%) = \frac{(\text{Increase in number of cells in treated cultures}(\text{final} - \text{starting}))}{(\text{Increase in numbers of cells in control cultures}(\text{final} - \text{starting}))} \times 100$$

$$\text{RPD}(\%) = \frac{(\text{No. of Population doublings in treated cultures})}{(\text{No. of population doublings in control cultures})} \times 100$$

fejn:

Irduppjar tal-Popolazzjoni = $[\log (\text{Numru ta' ċelloli wara t-trattament} \div \text{Numru ta' ċelloli inizjali})] \div \log 2$

B'hekk, RICC, jew RPD ta' 53 % jindikaw 47 % ċitotossičità/ċitostazi.

▼ **M7**

Billi jintuża **Indiċi tal-Proliferazzjoni (PI)**, iċ-ċitotossicità tista' tiġi vvalutata permezz tal-ghadd tan-numru ta' kloni li jikkonsistu f'ċellola 1 (cl1), 2 ċelloli (cl2), 3 sa 4 ċelloli (cl4) u 5 sa 8 ċelloli (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

Il-PI ntuża bħala parametru siewi u affidabbli taċ-ċitotossicità anki għal linji ta' ċelloli kkulturati *in vitro* fin-nuqqas ta' ċitoB (35) (36) (37) (38) u jista' jitqies bħala parametru addizzjonali siewi.

Fi kwalunkwe każ, l-ghadd ta' ċelloli qabel it-trattament għandu jkun l-istess għal kulturi tat-trattament u tal-kontroll negattiv.

Filwaqt li l-RCC (jiġifieri n-Numru ta' ċelloli f'kulturi tat-trattament/ Numru ta' ċelloli f'kulturi tal-kontroll) intuża bħala parametru taċ-ċitotossicità fl-imghoddi, illum ma għadux rakkomandat għaliex jista' jissottovaluta ċ-ċitotossicità

Meta jintużaw sistemi tal-klassifikazzjoni awtomatizzati, pereżempju, ċitometrija tal-fluss, ċitometrija ta' skennjar bil-laser jew analiżi tal-immāgnijiet, in-numru ta' ċelloli fil-formula jista' jiġi sostitwit bin-numru ta' nukleji.

Fil-kulturi tal-kontroll negattiv, l-irduppar tal-popolazzjoni jew l-indiċi tar-replikazzjoni għandu jkun kompatibbli mar-rekwiżit li jittiehed kampjun taċ-ċelloli wara t-trattament fi żmien ekwivalenti għal madwar darba u nofs sad-doppju tat-tul normali taċ-ċiklu taċ-ċelloli.

▼ M3

B.50. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODI TAL-LIMFA LOKALI: DA**INTRODUZZJONI**

1. Il-Linja gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, htigijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu tat-Test (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay — LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u analiżi tax-xogħol assoċjat ġew ippubblikati (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Fl-LLNA, tintuża t-timidina jew joġdu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwizizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: DA (żvilupp minn Daicel Chemical Industries, Ltd.) huwa modifikazzjoni mhux radjuattiva għall-LLNA, li tikkwantifika l-kontenut tat-trifosfat tal-adenozina (adenosine triphosphate, ATP) permezz ta' bijoluminexxenza bħala indikatur tal-proliferazzjoni tal-limfoċiti. Il-metodu ta' ttestjar LLNA: DA ġie vvalidat u analizzat u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari bħala utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12) (13). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u taħlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (14). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u z-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD) u LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.
2. B'mod simili għall-LLNA, l-LLNA: DA tistudja l-fażi ta' induzzjoni ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovi dejta kwantitattiva adattata għall-valutazzjoni tad-doża u r-reazzjoni. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda mingħajr il-htieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA teli-mina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naħa tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' grieden għall-individwazzjoni ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (14).

DEFINIZZJONIJIET

3. Definizzjonijiet użati huma pprovduti f'Appendiċi 1.

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: DA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni fil-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Dan mhux neċessarjament jimplika li fil-każijiet kollha, l-LLNA: DA għandha tintuża minflok it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (14), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-risultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jehtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fizikokimiċi tagħha; ir-risultati ta'

▼ M3

kwalunkwe test ta' tossicità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u dejta tossikologika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wiehed jiddetermina jekk l-LLNA: DA huwiex adattat għas-sustanza (minhabba n-nuqqas ta' kompatibilità ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: DA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

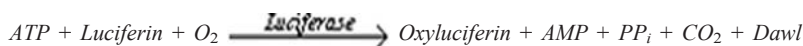
5. L-LLNA: DA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allergiku. Huwa għandu, madankollu, il-potenzjal li jnaqqas l-għadd ta' annimali meħtieġa għal dan il-ghan meta mqabbel mat-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (B.6; Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD) (14). Barra minn hekk, l-LLNA: DA toffri rfinar sostanzjali (inqas uġiħ u dwejjaq) fil-mod kif l-annimali jintużaw għal provi ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allergiku, minhabba li b'differenza mill-B.6 u mil-Linja Gwida 406 tat-Test tal-OECD, l-LLNA: DA ma jeħtieġx li reazzjonijiet ta' sensitività eċċessiva dermali indotti mill-isfida jiġu indikati. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: DA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jeħtieġu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-ġilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1 u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (16) jistgħu jeħtieġu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (14)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: DA (10). Barra minn hekk, l-użu tal-LLNA: DA ma jkunx xieraq għal sustanzi ta' ttestjar li jaffettwaw il-livelli tal-ATP (eż. sustanzi li jiffunzjonaw bħala inibituri tal-ATP) jew dawk li jaffettwaw il-kejl preċiż ta' ATP intracellolari (eż. il-preżenza ta' enzimi ta' degradazzjoni tal-ATP, il-preżenza ta' ATP ekstrakcellolari fin-nodi tal-limfa). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: DA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi li jistgħu jinterferixxu mal-eżattezza tal-LLNA: DA. Barra minn hekk, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-possibilità ta' riżultati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1,8 u 2,5 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 44 sustanza li jużaw SI $\geq$ 1,8 (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: DA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tlieta minn 12-il nonsensitizzaturi tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1,8 u 2,5 (jiġifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minhabba li l-istess sett ta' dejta ntūza għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJU TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju baziku wara l-LLNA: DA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfoċiti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allergen applikat u ttiprovdi mezz sempliċi ta' kif wiehed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wiehed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju,

▼ M3

imsejjah l-SI, jiġi stabbilit, u għandu jkun $\geq 1,8$ qabel ma tkun mehtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-gilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma bbażati fuq l-użu tal-kejl tal-kontenut ta' ATP b'bijoluminexxenza (magħrufa li tikkorrelata mal-ghadd ta' ċelloli ħajjin) (17) sabiex jiġi indikat għadd miżjud ta' ċelloli ta' proliferazzjoni fin-nodi tal-limfa awrikulari li jnixxu (18) (19). Il-metodu bijoluminexxenti juża l-enzima luċiferazi biex jikkatalizza l-formazzjoni tad-dawl minn ATP u luċiferin skont ir-reazzjoni li ġejja:



L-intensità tad-dawl emess hija relatata b'mod lineari mal-konċentrazzjoni tal-ATP u hija mkejla permezz ta' luminometru. L-analiżi ta' luċiferin-luċiferazi hija metodu sensitiv għall-kwantifikazzjoni tal-ATP użata f'firxa wiesgħa ta' applikazzjonijiet (20).

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

- Il-ġurdien huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-LLNA: DA twettqu esklussivament bir-razza CBA/J li għaldaqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (12) (13). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparużi u mhumex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħa u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: DA.

Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jiekl

- Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (21), sakemm ma tingħatax loġika xjentifika adegwata għat-tqeghid tal-ġrieden f'gagħg individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-ghalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-thejjija tal-annimali

- L-annimali għandhom jintgħazlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarrar fil-widnejn), u miżmuma fil-gagħg tagħhom għal mill-inqas hamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-gilda.

It-thejjija tas-soluzzjonijiet għad-dożar

- Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospizi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati wahedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżagerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jithejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

▼ M3

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontroll pożittiv (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproducibbli għal sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inkluzjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex din turi l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproducibbiltà fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jehtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mhegġa jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: DA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-htieġa ta' aktar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlahqu tali rekwiżiti li jistgħu jinholqu mill-użu ta' PC perjodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandha tipproduċi reazzjoni tal-LLNA: DA pożittiva flivell ta' esponiment li mistenni jagħti żieda fl-SI > 1,8 fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproducibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri SI > 10 ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldeid (Numru tal-Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0,) fl-aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minhabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.
12. Filwaqt li l-inkluzjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perjodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: DA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: DA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproducibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: DA tista' tintwera b'suċċess billi jiġi ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC f'mill-inqas 10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' zmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).
13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluz meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: DA (eż. bidla fil-persunal imharreg, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reagenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-annimali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-htieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.
14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perjodika minflok fl-istess hin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati negattivi ta' studju ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perjodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perjodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħhar studju tal-PC perjodika aċċettabbli u l-istudju tal-PC perjodika mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubjużi. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom ikunu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inkluzi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perjodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas annimali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (22).

▼ M3

15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat f'mezz li huwa magħruf li jeliċita reazzjoni konsistenti (eż. l-aċetun: żejt taż-żebbuġa; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom it-testijiet b'mezz mhux regolari (formulazzjoni klinika/kimikament rilevanti) ikunu meħtieġa wkoll (23). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluż VC separat għall-PC simultanju.
16. F'kazijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex jinstab il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:
 - xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,
 - karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,
 - dejta ta' appoġġ mil-LLNA: DA,
 - dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROCEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' dozi għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u PC (simultanja jew reċenti, ibbażata fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrati tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dozi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wiehed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti n-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu mmaniġġjati u trattati b'mod identiku bhall-annimali fil-gruppi tat-trattament.
18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi (2) u (24). Dozi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fizikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-ogħla konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (24) (25). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).
19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-ogħla konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebbuġa (4:1, v/v), N,N-dimetilformammi, metiletiketoni, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi jkunu inkorporati f'sistema ta' mezzi, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jhollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezz li kwidi għalkollox għandhom jiġu evitati.

▼ M3

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-ghadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tingabar dejta dwar annimali individwali (22). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Gbir regolari ta' dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mil-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun mehtieg li kieku r-risultati tas-sustanza tat-test li tkun ingabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta' dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma' rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta' doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: DA. L-iskop tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi għidha għall-ghazla tal-livell tad-doża massima li għandha tintuża fl-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, meta l-informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li tikkawża tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda (ara paragrafu 23) ma tkunx disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.
22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir taht l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: DA, hliet għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wiehed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 8). Iz-żewġ widniet ta' kull gurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (25). Jittiehed il-kejl tal-hxuna tal-widna permezz ta' geġġ ta' hxuna (eż. mikrometru diġitali jew geġġ tal-hxuna Peacock Dial) f'Jum 1 (qabel id-doża), f'Jum 3 (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), f'Jum 7 (24 siegħa qabel it-tmiem) u f'Jum 8. Barra minn hekk, f'Jum 8, il-hxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥ 3 u/jew hxuna tal-widna ta' ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (26) (27). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: DA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensjoni ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2

▼ M3

Osservazzjoni	Punteġġ
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (hmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġjat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra zieda ta' 25 % fil-hxuna tal-widna (26) (27), intużat ukoll zieda statistikament sinifikanti fil-hxuna tal-widna fil-grieden ittrattati meta mqabbla mal-grieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Madankollu, għalkemm jistgħu jsejtnu zidiet statistikament sinifikanti meta l-hxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċessiva (67) (31) (69) (70) (71).
24. L-osservazzjonijiet kliniċi li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (35) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: DA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, roġħda, u konvulzjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtugħ, u hsejjes mill-pulmun (rales)), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letargija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku iehor ta' aktar minn uġiħ jew tbatija żgħira jew momentanja, jew tnaqqis ta' > 5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 8 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġiħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (36).

Skeda sperimentali tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analiżi hija kif ġej:

- *Jum 1*: Identifika individwalment u hu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika soluzzjoni milwiema ta' 1 % sodju lauril sulfat (SLS) fuq il-parti ta' wara ta' kull widna billi tuża pinzell imbill fis-soluzzjoni ta' SLS sabiex tkopri d-dorsum ta' kull widna b'erba' jew hames pinzellati. Siegħa wara t-trattament bl-SLS, applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz wahdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrati tal-paragrafi 11–15), fuq in-naha ta' wara ta' kull widna.
- *Jiem 2, 3 u 7*: Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni ta' qabel it-trattament bis-sustanza milwiema ta' 1 % SLS u tas-sustanza tat-test imwettqa f'Jum 1.
- *Jiem 4, 5 u 6*: L-ebda trattament.
- *Jum 8*: Hu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Bejn wiehed u iehor 24 sa 30 siegħa wara l-bidu tal-applikazzjoni f'Jum 7, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-ġurdien u pproċessa separatament f'soluzzjoni ta' ilma bil-melħ ibbaferjata bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (22). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-gilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inkluzi parametri oħrajn bħall-ghoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-hxuna tal-widna (miksba kemm permezz ta' geġg tal-hxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarrar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

▼ M3

It-thejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli

26. Minn kull ġurdien, tithejja sospensjoni ta' ċellola singola ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC — lymph node cells) maqtugħin bilateralment billi n-nodi limfatiċi jitpoġġew mgħaffġin bejn żewġ slajds tal-ħġieg u tiġi applikata pressjoni hafifa sabiex in-nodi jitgħaffġu. Wara li jiġi kkonfermat li t-tessut infirex irqiq, irqiq, issepara ż-żewġ slajds minn ma' xulxin. Issospendi t-tessut fuq iż-żewġ slajds fil-PBS billi żżomm kull slajd f'angolu fuq id-dixx Petri u filwaqt li tlahlah b'PBS waqt li fl-istess hin tqaxxar it-tessut mill-island bi scraper taċ-ċelloli. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. Għandu jintuża volum total ta' 1 mL PBS għat-tlahliħ taż-żewġ slajds. Is-sospensjoni tal-LNC fid-dixx Petri għandha tiġi omogenizzata kemmxajn bl-iscraper taċ-ċelloli. Imbagħad jingabar alikwott ta' 20 µL tas-sospensjoni tal-LNC b'mikropipetta, filwaqt li wiehed joqghod attent li ma jhux il-membrana li hija vizibbli għall-ġhajn, u sussegwentament jithallat ma' 1,98 mL tal-PBS biex jagħti kampjun ta' 2 mL. Imbagħad jithejja t-tieni kampjun ta' 2 mL, billi tintuża l-istess proċedura sabiex jithejjew żewġ kampjuni għal kull annimal.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-ATP tal-limfoċiti)

27. Żidiet fil-kontenut ta' ATP fin-nodi limfatiċi jitkejlu bil-metodu luċiferin-/luċiferazi li juża kit tal-kejl tal-ATP, li jkejjel il-bijoluminexxenza f'Unitajiet ta' Luminesxenza Relattiva (Relative Luminescence Units — RLU). Il-hin tal-analizi mill-hin tal-qatla tal-annimal sal-kejl tal-kontenut ta' ATP għal kull annimal individwali għandu jinżamm uniformi, fi żmien bejn wiehed u iehor 30 minuta minhabba li l-kontenut ta' ATP huwa meġjus li gradwalment jonqos mal-hin wara l-qatla tal-annimal (12). B'hekk, is-serje ta' proċeduri mill-qtugħ tan-nodi limfatiċi awrikulari sal-kejl tal-ATP għandha titlesta fi żmien 20 minuta permezz tal-iskeda ta' żmien predeterminata li hija l-istess għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP għandha titkejjel f'kull kampjun ta' 2 mL sabiex jingabar total ta' żewġ kejljiet ta' ATP għal kull annimal. Il-luminexxenza tal-ATP medja tiġi mbagħad stabilizzata u użata f'kalkoli sussegwenti (ara paragrafu 30).

OSSERVAZZJONIJIET**Osservazzjonijiet kliniċi**

28. Kull ġurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull ġurdien. Il-pjanijiet ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanażja (36).

Pizijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-pizijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wiehed jiddividi l-RLU/ġurdien medju f'kull grupp tas-sustanza tat-test, u l-grupp tal-PC, bl-RLU/ġurdien medju għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wiehed.

▼ M3

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqis riżultat bħala pożittiv meta $SI \geq 1,8$ (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reazzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reazzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wiehed jiddetermina jekk riżultat marginali (jiġifieri valur SI bejn 1,8 u 2,5) jiġix iddikjarat pożittiv (2) (3) (37).
32. Għal rispons pożittiv marginali bejn SI ta' 1,8 u 2,5, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reazzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pożittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li jgħolqu sensitizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall f'parti oħra (4).
33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanju). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reazzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħzel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jehtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jehtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analizijiet statistiċi bi jew minghajr ċerti punti ta' dejta (li xi drabi jissejju "anomalji" (outliers)).

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-RLU tal-annimal individwali, l-RLU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' żball assoċjat tiegħu (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' dozi meta mqabbel mas-solvent/grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

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

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll

- dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritajiet magħrufa; in-numru tal-lott),
- in-natura fiżika u l-karatteristiċi fizikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbilità, solubilità),
- jekk tahlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti,

Solvent/mezz

- dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat),
- raġuni għall-ghażla tal-mezz,

▼ **M3**

Animali tat-test

- is-sors tal-ġrieden tas-CBA,
- l-istatus mikrobijoloġiku tal-annimali, meta jkun magħruf,
- l-ġhadd u l-età tal-annimali,
- is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-ġaġeġ, id-dieta, eċċ.,

Kondizzjonijiet tat-test,

- is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità għall-kit tal-ATP,
- dettalji dwar it-thejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,
- raġuni għall-ġhażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),
- il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikat,
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),
- dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-tehid ta' kampjuni,
- metodi ta' kejl tat-tossiċità,
- kriterji li ntużaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,
- dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju,

Verifika tal-affidabilità:

- sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabbiltà, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati,
- PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta negattiva simultanja (solvent/-mezz) għal-laboratorju li qed jaġhmel it-test,
- jekk ma kinitx inkluża PC simultanja, id-data u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perjodika reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta tal-PC storika għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma saritx PC simultanja,

Ir-riżultati,

- piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla skedata; kif ukoll it-terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,
- il-hin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossiċità, inkluża l-irritazzjoni tal-ġilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,
- hin tat-tmiem tal-annimal u hin tal-kejl ATP għal kull annimal,
- tabella tal-valuri RLU tal-ġurdien individwali u valuri SI għal kull grupp ta' trattament tad-doża,
- terminu ta' żball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal RLU/ġurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analiżi ta' barra għal kull grupp ta' trattament,

▼ M3

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analizijiet statistiċi, fejn xieraq,

Diskussjoni tar-riżultati

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-gilda.

LETTERATURA

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999–1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985–997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49–59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258–273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274–286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249–257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]

▼ M3

- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPR-PR rept2009.pdf].
- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1–10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11–26.
- (14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896–1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90–96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81–88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127–132.
- (19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27–34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346–370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13–31.
- (25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195–206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491–506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60–68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023–1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/_workshop.htm]
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563–79.
- (38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preciżjoni: Il-qribija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (38).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Is-sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin; (i) sors(i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżikokimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza identifikata hażin bħala negattiva jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva.

Pożittiv falz: Sustanza identifikata hażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva.

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħha jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u iehor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanzi tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u iehor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjah ukoll riproduribbiltà bejn laboratorji (38).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi hdan l-istess laboratorju jista' jirnexxilhom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjah ukoll riproduribbiltà fi hdan il-laboratorju (38).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Assigurazzjoni tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-rekwiżiti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-precizjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn dawk li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi hdan laboratorju u bejn laboratorju u iehor (38).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunoloġiku li jiffaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allergen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka rispons immuni fil-ġilda li jista' jwassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

▼ M3

B.51. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA: ANALIŻI TAN-NODULU LIMFATIKU LOKALI BRDU-ELISA**INTRODUZZJONI**

1. Il-Linja gwida tal-OECD għall-Ittestjar tas-Sustanzi Kimiċi u l-Metodi ta' Ttestjar tal-UE bbażati fuqhom jiġu analizzati minn żmien għal żmien fid-dawl tal-progress xjentifiku, htigijiet regolatorji li jinbidlu, u konsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali. L-ewwel Metodu ta' Ttestjar (TM) (B.42) għad-determinazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda fil-ġurdien, l-Analiżi tan-Nodi tal-Limfa Lokali (Local Lymph Node Assay — LLNA; Linja gwida 429 tat-Test tal-OECD) ġie rivedut (1 u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness). Id-dettalji tal-validazzjoni tal-LLNA u l-analiżi tax-xogħol assoċjat magħha ġew ippubblikati (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Fl-LLNA, tintuża timidina jew joidu radjoisotopiku biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti u għaldaqstant, l-analiżi għandha użu limitat fejn l-akkwiżizzjoni, l-użu jew l-eliminazzjoni tar-radjuattività huma problematiċi. L-LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Analiżi Immunosorbenti Relatata ma' Enzima)] huwa modifika mhux radjuattiva għat-TM tal-LLNA, li tuża 5-bromo-2-deossiuridina (BrdU) mhux radjutikkettata (Chemical Abstracts Service [CAS] Nru 59-14-3) f'sistema ta' test ibbażata fuq ELISA biex titkejjel il-proliferazzjoni tal-limfoċiti. L-LLNA: BrdU-ELISA ġie vvalidat u rivedut u rakkomandat minn panil internazzjonali ta' analiżi minn pari xjentifika u indipendenti meqjus utli għall-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi sensitizzanti u mhux sensitizzanti, b'ċerti limitazzjonijiet (10) (11) (12). Dan it-TM huwa mfassal għall-valutazzjoni tal-potenzjal tas-sustanzi kimiċi li jikkawżaw sensitizzazzjoni tal-ġilda (sustanzi u tahlitiet) fl-annimali. Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD jużaw fniek tal-Indi, b'mod partikolari t-test ta' massimizzazzjoni tal-fniek tal-Indi u t-test Buehler (13). L-LLNA (Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 429 tat-Test OECD) u ż-żewġ modifikazzjonijiet mhux radjuattivi, LLNA: BrdU-ELISA (Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 B tat-Test OECD) u LLNA: DA (Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness; Linja Gwida 442 A tat-Test OECD), kollha jipprovdu vantaġġ fuq it-testijiet tal-fniek tal-Indi f'B.6 u fil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13) f'termini ta' tnaqqis u rfinar tal-użu tal-annimali.
2. B'mod simili għall-LLNA, l-LLNA: BrdU-ELISA tistudja l-fażi tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda u tipprovi dejta kwantitattiva xierqa għall-valutazzjoni tar-reazzjoni tad-doża. Barra minn hekk, abilità li jinkixfu sensitizzaturi tal-ġilda minghajr il-htieġa li tintuża radjutikketta għad-DNA telimina l-potenzjal għal esponiment fuq il-post tax-xogħol għal kwistjonijiet ta' radjuattività u ta' rimi ta' skart. Min-naha tiegħu, dan jista' jippermetti għall-użu miżjud ta' grieden għall-kxif ta' sensitizzaturi tal-ġilda, li jnaqqas ulterjorment l-użu tal-fniek tal-Indi għal testijiet għal potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD) (13).

DEFINIZZJONIJIET

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

KONSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu tal-LLNA modifikat għall-identifikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanzi kimiċi li huma sensitizzanti għall-ġilda, b'limitazzjonijiet speċifiċi. Din id-doża mhux neċessarjament timplika li f'kull każ, l-LLNA: BrdU-ELISA għandha tintuża minflok l-LLNA jew it-testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jiġifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-test OECD) (13), iżda pjuttost li l-analiżi għandha l-istess mertu u tista' tintuża bħala alternattiva li fiha r-riżultati pożittivi u negattivi ġeneralment ma jkunux jehtieġu aktar konferma (10) (11). Il-laboratorju tal-ittestjar għandu jikkunsidra l-informazzjoni disponibbli kollha fuq is-sustanza tat-test qabel iwettaq l-istudju. Din l-informazzjoni għandha tinkludi l-identità u l-istruttura kimika tas-sustanza tat-test; il-karatteristiċi fiżikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossiċità *in vitro* jew *in vivo* fuq is-sustanza tat-test; u

▼ M3

dejta tossikologika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati. Din l-informazzjoni għandha titqies sabiex wiehed jiddetermina jekk l-LLNA: BrdU-ELISA hijiex adattata għas-sustanza (minhabba n-nuqqas ta' kompatibbiltà ta' tipi limitati ta' sustanzi kimiċi mal-LLNA: BrdU-ELISA [ara paragrafu 5]) u sabiex tgħin fl-għażla tad-doża.

5. L-LLNA: BrdU-ELISA huwa metodu *in vivo* u, b'konsegwenza ta' dan, ma jeliminax l-użu tal-annimali fil-valutazzjoni ta' attività ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allergiku. Madankollu, għandu l-potenzjal li jnaqqas l-użu tal-annimali għal dan il-ghan meta mqabbel mat-testijiet bil-fniek tal-Indi (B.6; Linja gwida 406 tal-OECD) (13). Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA joffri rfinar sostanzjali tal-mod kif jintużaw l-annimali għall-ittestjar ta' sensitizzazzjoni ta' kuntatt allergiku, minhabba li b'differenza minn B.6. u mil-Linja Gwida 406 tat-Test OECD, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jehtiegx li r-reazzjonijiet ta' ipersensittività dermalni indotti bi sfida jkunu enfasizzati. Barra minn hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA ma jehtiegx l-użu ta' aġġuvant, bħal fil-każ tat-test tal-massimizzazzjoni tal-fenek tal-Indi (Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness, 13). B'hekk, l-LLNA: BrdU-ELISA inaqqas id-dieqa tal-annimal. Minkejja l-vantaġġi tal-LLNA: BrdU-ELISA fuq B.6 u l-Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13), hemm xi limitazzjonijiet li jistgħu jehtiegu l-użu ta' B.6 u l-Linja Gwida 13 tat-Test OECD (eż. l-ittestjar ta' ċerti metalli, sejbiet pożittivi foloz b'ċerti irritanti tal-gilda [bħal xi sustanzi tat-tip tensjoattivi] (6) (1, u l-Kapitolu B.42 f'dan l-Anness), solubilità tas-sustanza tat-test). Barra minn hekk, il-klassijiet ta' sustanzi kimiċi jew sustanzi li fihom gruppi funzjonali li ntwerew li jaġixxu bħala konfondituri potenzjali (15) jistgħu jehtiegu l-użu ta' testijiet fuq il-fniek tal-Indi (jigifieri B.6; Linja Gwida 406 tat-Test OECD (13)). Limitazzjonijiet li ġew identifikati għal-LLNA (1, u Kapitolu B.42 f'dan l-Anness) ġew rakkomandati sabiex japplikaw ukoll għal-LLNA: BrdU-ELISA (10). Minbarra dawn il-limitazzjonijiet identifikati, l-LLNA: BrdU-ELISA għandu jkun applikabbli għall-ittestjar ta' kwalunkwe sustanza kimika diment li ma jkunx hemm karatteristiċi assoċjati ma' dawn is-sustanzi kimiċi li jistgħu jinterferixxu mal-preċiżjoni tal-LLNA: BrdU-ELISA. Barra minn hekk, għandha tinghata konsiderazzjoni għall-possibiltà ta' riżultati pożittivi tal-limitu meta jinkisbu valuri ta' Indiċi ta' Stimulazzjoni (SI) ta' bejn 1,6 u 1,9 (ara l-paragrafi 31-32). Dan huwa bbażat fuq il-bażi ta' dejta ta' validazzjoni ta' 43 sustanza li jużaw $SI \geq 1,6$ (ara paragrafu 6) li għalihom, l-LLNA: BrdU-ELISA identifika b'mod korrett it-32 sensitizzatur tal-LLNA, iżda b'mod inkorrett identifika tnejn minn 11-il nonsensitizzatur tal-LLNA b'valuri tal-SI ta' bejn 1,6 u 1,9 (jigifieri linja tal-limitu pożittiva) (10). Madankollu, minhabba li l-istess sett ta' dejta ntuża għall-issettjar tal-valuri SI u għall-kalkolu tal-karatteristiċi ta' tbassir tat-test, ir-riżultati ddikjarati jistgħu jkunu stima eċċessiva tal-karatteristiċi ta' tbassir reali.

PRINĊIPJI TA' DAN IL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-prinċipju bażiku wara l-LLNA: BrdU-ELISA huwa li s-sensitizzaturi jikkawżaw il-proliferazzjoni ta' limfociti fin-noduli tal-limfa li jsaffu s-sit tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Din il-proliferazzjoni hija proporzjonata mad-doża u mal-qawwa tal-allergen applikat u tipprovi mezz sempliċi ta' kif wiehed jikseb kejl kwantitattiv ta' sensitizzazzjoni. Il-proliferazzjoni titkejjel billi wiehed iqabbel il-proliferazzjoni medja f'kull grupp tat-test mal-proliferazzjoni medja fil-grupp ta' kontroll ittrattati bil-mezzi (VC). Il-proporzjon tal-proliferazzjoni medja f'kull grupp ittrattat ma' dak fil-grupp VC simultanju, imsejjah l-SI, jiġi stabbilit, u għandu jkun $\geq 1,6$ qabel ma tkun mehtieġa evalwazzjoni ulterjuri tas-sustanza tat-test bħala sensitizzatur potenzjali tal-gilda. Il-proċeduri deskritti hawnhekk huma

▼ M3

bbażati fuq l-użu tal-kejl tal-kontenut tal-BrdU biex jindika għadd miżjud ta' ċelloli proliferanti fin-noduli tal-limfa awrikolari li jsaffu. BrdU huwa analoġu ta' timidina u jiġi inkorporat b'mod simili fid-DNA ta' ċelloli li jipprolifera. L-inkorporazzjoni tal-BrdU titkejjel b'ELISA, li tuża antikorp speċifiku għall-BrdU li huwa ttikkettat ukoll b'perossidazi. Meta jiżjed is-substrat, il-perossidazi jirreaġixxi mas-substrat biex jipproduċi prodott ikkolorit li jiġi kwantifikat b'assorbenza speċifika permezz ta' qarrej tal-plakka f'livell ta' microtitre.

DESKRIZZJONI TAL-ANALIŻI

Għażla tal-ispeċi tal-annimali

7. Il-ġrieden huwa l-ispeċi tal-għażla għal dan it-test. Studji ta' validazzjoni għal-BrdU-ELISA twettqu esklussivament bir-razza CBA/JN li għaldaqstant hija kkunsidrata r-razza ppreferuta (10) (12). Jintużaw ġrieden nisa adulti żgħar, li huma nulliparużi u mhumex tqal. Fil-bidu tal-istudju, l-annimali għandu jkollhom bejn 8 ġimgħat u 12-il ġimgħa, u l-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx l-20 % tal-piż medju. Inkella, jistgħu jintużaw razez oħrajn u ġrieden irġiel meta tkun iġġenerata biżżejjed dejta li turi li ma jeżistux differenzi sinifikanti speċifiċi għar-razez u/jew għas-sess fir-reazzjoni għal-LLNA: BrdU-ELISA.

Kundizzjonijiet ta' fejn jinżammu u x'jieklu

8. Il-ġrieden għandhom jinżammu fi gruppi (16), sakemm ma tinghatax loġika xjentifika adegwata għat-tqeghid tal-ġrieden f'gagħġ individwali. It-temperatura tal-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 ± 3 °C. Għalkemm l-umidità relattiva għandha tkun mill-inqas 30 % u preferibbilment ma taqbiżx is-70 %, għajr waqt it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u s-sekwenza tkun 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Għall-għalf, jistgħu jintużaw id-dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista mingħajr limitu ta' ilma tax-xorb.

It-thejjja tal-annimali

9. L-annimali għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju, immarkati sabiex ikunu jistgħu jiġu identifikati individwalment (iżda mingħajr l-ebda forma ta' mmarrar fil-widnejn), u miżmuma fil-gagħġ tagħhom għal mill-inqas hamest ijiem qabel ma jibda d-dożar sabiex ikunu jistgħu jidraw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Qabel il-bidu tat-trattament, l-annimali kollha jiġu eżaminati sabiex ikun żgurat li huma ma jkollhom l-ebda feriti osservabbli fuq il-ġilda.

It-thejjja tas-soluzzjonijiet għad-dożar

10. Is-sustanzi kimiċi solidi għandhom jinħallu jew jiġu sospizi f'solventi/mezzi u dilwiti, jekk ikun xieraq, qabel l-applikazzjoni fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi kimiċi likwidi jistgħu jiġu applikati wahedhom jew dilwiti qabel id-dożar. Is-sustanzi kimiċi li ma jinħallux, bħal dawk li naraw ġeneralment fl-apparat mediku, għandhom ikunu soġġetti għal estrazzjoni eżagerata f'solvent adattat sabiex jiżvelaw il-kostitwenti kollha li jistgħu jiġu estratti għall-ittestjar qabel jiġu applikati fuq il-widna tal-ġrieden. Is-sustanzi tat-test għandhom jitthejjew kuljum sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix li jistgħu jinħażnu.

Il-verifika tal-affidabbiltà

11. Sustanzi kimiċi ta' kontrolli pożittivi (PC) jintużaw sabiex tintwera prestazzjoni xierqa tal-analiżi billi jirreaġixxu b'sensittività adegwata u riproduttibilità bħala sustanza tat-test sensitizzanti li għaliha l-kobor tar-reazzjoni huwa kkaratterizzat sew. L-inkluzjoni ta' PC simultanju hija rrakkomandata għaliex dan juri l-kompetenza tal-laboratorju biex iwettaq b'suċċess kull analiżi u tippermetti l-valutazzjoni u t-tqabbil tar-riproduttibilità fil-laboratorju u bejn il-laboratorji. Xi awtoritajiet regolatorji jehtieġu wkoll PC għal kull studju u għaldaqstant, l-utenti huma mhegga jikkonsultaw mal-awtoritajiet rilevanti qabel iwettqu l-LLNA: BrdU-ELISA. Għalhekk, l-użu ta' rutina ta' PC simultanju huwa rrakkomandat sabiex tiġi evitata l-htieġa ta' attar ittestjar fuq l-annimali sabiex jintlahqu tali rekwiżiti li jistgħu jinholqu mill-użu ta' PC perijodiku (ara l-paragrafu 12). Il-PC għandu jipproduċi rispons pożittiv tal-LLNA: BrdU-ELISA f'livell ta' esponiment

▼ M3

li mistenni jaghti zieda $fl-SI > 1,6$ fuq il-grupp ta' kontroll negattiv (NC). Id-doża tal-PC għandha tintgħażel b'mod li ma tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda jew tossiċità sistemika u l-induzzjoni hija riproducibbli iżda mhux eċċessiva (jiġifieri $SI > 14$ ikun jitqies eċċessiv). PC ippreferuti huma 25 % eżil ċinnamaldehyd (Numru tal-CAS 101-86-0) u 25 % ewġenol (numru tal-CAS 97-53-0) fl-aċetun:żejt taż-żebuga (4:1, v/v). Jista' jkun hemm ċirkostanzi fejn, minhabba ġustifikazzjoni adegwata, jistgħu jintużaw PCs oħrajn, li jissodisfaw il-kriterji ta' hawn fuq.

12. Filwaqt li l-inkluzjoni ta' grupp ta' PC simultanju hija rrakkomandata, jista' jkun hemm sitwazzjonijiet fejn l-ittestjar perijodiku (jiġifieri f'intervalli ≤ 6 xhur) tal-PC jista' jkun adegwat għal-laboratorji li jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA b'mod regolari (jiġifieri jagħmlu l-LLNA: BrdU-ELISA fi frekwenza ta' mhux inqas minn darba fix-xahar) u għandhom bażi tad-dejta ta' PC storika stabbilita li turi l-kapaċità tal-laboratorju biex jikseb riżultati riproducibbli u eżatti b'PCs. Profiċjenza adegwata bl-LLNA: BrdU-ELISA tista' tintwera b'suċċess billi jiġu ġġenerati riżultati pożittivi konsistenti bil-PC mill-inqas f'10 testijiet indipendenti li jsiru f'perjodu ta' żmien raġonevoli (jiġifieri inqas minn sena waħda).
13. Grupp ta' PC simultanju għandu dejjem ikun inkluz meta jkun hemm bidla fil-proċedura tal-LLNA: BrdU-ELISA (eż. bidla fil-persunal imharreġ, bidla fil-materjali tal-metodu tat-test u/jew fir-reagenti, bidla fit-tagħmir tal-metodu tat-test, bidla fis-sors tal-animali tat-test), u dawn il-bidliet għandhom jiġu ddokumentati fir-rapporti tal-laboratorju. Għandu jiġi kkunsidrat l-impatt ta' dawn il-bidliet fuq l-adegwatezza tal-bażi tad-dejta storika stabbilita qabel ma tiġi deċiża l-htieġa li tkun stabbilita bażi tad-dejta storika ġdida sabiex tiddokumenta l-konsistenza fir-riżultati tal-PC.
14. Ir-riċerkaturi għandhom ikunu konxji li d-deċiżjoni li jsir studju tal-PC fuq bażi perijodika minflok fl-istess hin għandha konsegwenzi fuq l-adegwatezza u l-aċċettabbiltà tar-riżultati ta' studju negattivi ġġenerati mingħajr PC simultanju waqt l-intervall bejn kull studju tal-PC perijodiku. Pereżempju, jekk jinkiseb riżultat negattiv falz fl-istudju tal-PC perijodiku, ir-riżultati negattivi tas-sustanza tat-test miksuba fl-intervall bejn l-aħħar studju tal-PC perijodiku aċċettabbli u l-istudju tal-PC perijodiku mhux aċċettabbli jistgħu jkunu dubbjużi. L-implikazzjonijiet ta' dawn l-eżiti għandhom jiġu kkunsidrati b'attenzjoni meta jkun deċiż jekk għandhomx ikunu inkluzi PCs simultanji jew li jsiru biss PCs perijodiċi. Għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-użu ta' inqas animali fil-grupp ta' PC simultanju meta dan ikun iġġustifikat xjentifikament u jekk il-laboratorju juri, fuq dejta storika speċifika għal-laboratorju, li jistgħu jintużaw inqas ġrieden (17).
15. Għalkemm il-PC għandu jiġi ttestjat fil-mezz li huwa magħruf li jqanqal reazzjoni konsistenti (eż. aċetun: żejt taż-żebuga; 4:1, v/v), jista' jkun hemm ċerti sitwazzjonijiet regolatorji li fihom l-ittestjar f'mezz mhux standard (formulazzjoni rilevanti klinikament/kimikament) ikun mehtieġ ukoll (18). Jekk il-PC simultanju jiġi ttestjat f'mezz differenti mis-sustanza tat-test, allura għandu jiġi inkluz VC separat għall-PC simultanja.

▼ M3

16. F'kazijiet fejn ikunu qegħdin jiġu vvalutati sustanzi tat-test ta' klassi speċifika ta' sustanzi kimiċi jew firxa ta' reazzjonijiet, is-sustanzi ta' referenza jistgħu jkunu utli wkoll sabiex juru li l-metodu ta' ttestjar qed jaħdem sew sabiex isib il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' dawn it-tipi ta' sustanzi tat-test. Is-sustanzi ta' referenza adattati għandu jkollhom il-karatteristiċi li ġejjin:

— xebh strutturali u funzjonali mal-klassi ta' sustanzi tat-test li qegħdin jiġu ttestjati,

— karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa,

— dejta ta' appoġġ mil-LLNA: BrdU-ELISA,

— dejta ta' appoġġ minn mudelli oħrajn ta' annimali u/jew mill-bnedmin.

IL-PROCEDURA TAT-TEST

Għadd ta' annimali u livelli tad-doża

17. Għal kull grupp ta' doża għandhom jintużaw tal-inqas erba' annimali, b'minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, flimkien ma' grupp ta' NC simultanju ttrattat biss bil-mezz għas-sustanza tat-test, u grupp ta' PC (simultanju jew reċenti, ibbażat fuq il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrati tal-paragrafi 11-15). Għandu jiġi kkunsidrat l-ittestjar ta' dozi multipli tal-PC, b'mod speċjali meta wiehed jittestja l-PC fuq bażi intermittenti. Apparti fin-nuqqas ta' trattament bis-sustanza tat-test, l-annimali fil-gruppi ta' kontroll għandhom jiġu ġestiti u ttrattati b'mod identiku għall-annimali fil-gruppi tat-trattament.
18. L-għażla tad-doża u tal-mezz għandha tkun ibbażata fuq ir-rakkomandazzjonijiet mogħtija fir-referenzi 2 u 19. Dozi konsekuttivi normalment jintgħażlu minn sensiela xierqa ta' konċentrazzjonijiet bħal 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, eċċ. Loġika xjentifika adegwata għandha takkumpanja l-għażla tas-sensiela ta' konċentrazzjonijiet użati. L-informazzjoni tossikoloġika kollha eżistenti (eż. tossiċità akuta u irritazzjoni fil-ġilda) u l-informazzjoni strutturali u fiżikokimika dwar is-sustanza tat-test ta' interess (u/jew sustanzi relatati strutturalment) għandhom jiġu kkunsidrati meta jkunu disponibbli, fl-għażla tat-tliet konċentrazzjonijiet konsekuttivi biex b'hekk l-oġġa konċentrazzjoni timmassimizza l-esponiment filwaqt li tevita t-tossiċità sistemika u/jew l-irritazzjoni lokali eċċessiva fil-ġilda (19)(20 u Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Fin-nuqqas ta' informazzjoni bħal din, jista' jkun meħtieġ test inizjali qabel l-iskrinjar (ara l-paragrafi 21-24).
19. Il-mezz ma għandux jinterferixxi ma' jew jinfluwenza r-riżultat tat-test u għandu jintgħażel fuq il-bażi tal-massimizzazzjoni tas-solubbiltà sabiex tinkiseb l-oġġa konċentrazzjoni li tista' tinkiseb filwaqt li tiġi prodotta soluzzjoni/sospensjoni adattata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Il-mezzi rakkomandati huma aċetun: żejt taż-żebuga (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamid, metiletilketon, propilen glikol, u dimetilsulfossidu (6) iżda jistgħu jintużaw oħrajn jekk tingħata loġika xjentifika suffiċjenti. F'ċerti sitwazzjonijiet, jista' jkun meħtieġ li jsir użu minn solvent kimikament rilevanti jew mill-formulazzjoni kummerċjali li fiha s-sustanza tat-test hija kkummerċjalizzata bħala kontroll addizzjonali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari sabiex ikun żgurat li s-sustanzi idrofiliċi tat-test ikunu inkorporati f'sistema ta' mezz, li xxarrab il-ġilda u ma ċċarċarx mal-ewwel, permezz tal-inkorporazzjoni ta' sustanzi li jhollu xierqa (eż. 1 % Pluronic® L92). Għalhekk, mezz għal kollox likwidi għandhom jiġu evitati.

▼ M3

20. L-ipproċessar ta' noduli tal-limfa minn ġrieden individwali jippermetti l-valutazzjoni tal-varjabbiltà bejn l-annimali u tqabbil statistiku tad-differenza bejn is-sustanza tat-test u l-kejl tal-grupp VC (ara paragrafu 33). Barra minn hekk, il-valutazzjoni tal-possibbiltà li jitnaqqas l-ghadd ta' ġrieden fil-grupp PC hija fattibbli meta tingabar dejta dwar annimali individwali (17). Barra minn hekk, ċerti awtoritajiet regolatorji jitolbu l-ġbir ta' dejta dwar annimali individwali. Ġbir regolari ta' dejta dwar annimali individwali jipprovdi vantaġġ mil-lat tal-benesseri tal-annimal billi jevita ttestjar doppju li jkun mehtieg li kieku r-riżultati tas-sustanza tat-test li tkun ingabret oriġinarjament b'xi mod (eż. permezz ta' dejta miġbura dwar l-annimali) kellhom jiġu kkunsidrati aktar tard mill-awtoritajiet regolatorji ma' rekwiżiti oħrajn (eż. dejta individwali dwar l-annimali).

Test ta' qabel l-iskrinjar

21. Fin-nuqqas ta' informazzjoni sabiex tkun stabbilita l-ogħla doża li għandha tiġi ttestjata (ara paragrafu 18), għandu jsir test ta' qabel l-iskrinjar sabiex jiġi definit il-livell ta' doża xierqa li għandha tiġi ttestjata fl-LLNA: BrdU-ELISA. L-għan tat-test ta' qabel l-iskrinjar huwa li jipprovdi gwida għall-ghażla tal-livell tad-doża massima għall-użu fl-istudju tal-LLNA: BrdU-ELISA prinċipali, fejn informazzjoni dwar il-konċentrazzjoni li twassal għal tossiċità sistemika (ara paragrafu 24) u/jew għal irritazzjoni eċċessiva lokali tal-ġilda (ara paragrafu 23) mhijiex disponibbli. Il-livell massimu tad-doża ttestjata għandu jkun konċentrazzjoni ta' 100 % tas-sustanza tat-test għal-likwidi jew il-konċentrazzjoni massima possibbli għas-solidi jew għas-sospensjonijiet.
22. It-test ta' qabel l-iskrinjar isir taht l-istess kundizzjonijiet tal-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA, hlief għall-fatt li ma hemmx valutazzjoni tal-proliferazzjoni tan-noduli tal-limfa u li jistgħu jintużaw inqas annimali għal kull grupp ta' doża. Huwa ssuġġerit li jintuża annimal wiehed jew tnejn għal kull grupp ta' doża. Il-ġrieden kollha jiġu osservati kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni lokali fis-sit tal-applikazzjoni. Il-piżijiet tal-ġisem jiġu ddokumentati qabel it-test u wara li jintemm (Jum 6). Iz-żewġ widniet ta' kull ġurdien jiġu osservati għall-eritema u jingħataw punteġġ skont it-Tabella 1 (20, u Kapitolu B.4 ta' dan l-Anness). Jittiehed il-kejl tal-hxuna tal-widna permezz ta' gejġ ta' hxuna (eż. mikrometru diġitali jew gejġ tal-hxuna Peacock Dial) fl-ewwel Jum (qabel id-doża), fit-tielet Jum (madwar 48 siegħa wara l-ewwel doża), u fis-sitt Jum. Barra minn hekk, fis-sitt Jum, il-hxuna tal-widna tista' tiġi stabbilita permezz ta' determinazzjonijiet tal-piż bl-immarkar tal-widnejn, li għandu jsir wara li l-annimali jinqatlu b'mod uman. L-irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda hija indikata b'punteġġ ta' eritema ≥ 3 u/jew hxuna tal-widna ta' ≥ 25 % fi kwalunkwe jum tal-kejl (21) (22). L-ogħla doża magħżula għall-istudju ewlieni tal-LLNA: BrdU-ELISA tkun id-doża l-aktar baxxa li jmiss fis-sensjela ta' konċentrazzjonijiet ta' qabel l-iskrinjar (ara paragrafu 18) li ma tikkawżax tossiċità sistemika u/jew irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda.

Tabella 1

Punteġġi għall-Eritema

Osservazzjoni	Punteġġ
L-ebda eritema	0
Ftit li xejn eritema (bil-kemm tidher)	1
Eritema definita sew	2

▼ M3

Osservazzjoni	Punteġġ
Eritema moderata sa severa	3
Eritema severa (hmura qawwija) sa formazzjoni ta' tessut oħxon u danneġġat li jipprevjeni l-klassifikazzjoni tal-eritema	4

23. Minbarra zieda ta' 25 % fil-hxuna tal-widna (21) (22), intużat ukoll zieda statistikament sinifikanti fil-hxuna tal-widna fil-grieden ittrattati meta mqabbla mal-grieden tal-kontroll sabiex jiġu identifikati sustanzi irritanti fl-LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Madankollu, għalkemm jistgħu jsehhu židiet statistikament sinifikanti meta l-hxuna tal-widna tkun inqas minn 25 % dawn ma ġewx assoċjati b'mod speċifiku ma' irritazzjoni eċċes-siva (25) (26) (27) (28) (29).

24. L-osservazzjonijiet klinici li ġejjin jistgħu jindikaw tossiċità sistemika (30) meta jintużaw bħala parti minn valutazzjoni integrata u għalhekk jistgħu jindikaw il-livell massimu tad-doża li għandha tintuża fl-LLNA: BrdU-ELISA ewlenija: bidliet fil-funzjoni tas-sistema nervuża (eż. pil wieqaf, atassja, roġħda, u konvulżjonijiet); bidliet fl-imġiba (eż. aggressività, bidla fl-attività tal-indafa, bidla sinifikanti fil-livell ta' attività); bidliet fit-tendenzi respiratorji (jiġifieri bidliet fil-frekwenza u fl-intensità tan-nifs bħal dispneja, nifs maqtuġħ, u hsejjes mill-pulmun (rales), u bidliet fil-konsum tal-ikel u tal-ilma. Barra minn hekk, sinjali ta' letarġija u/jew nuqqas ta' reazzjoni u kull sinjal kliniku iehor ta' aktar minn uġiħ jew tbatija zghira jew momentanja, jew tnaqqis ta' > 5 % fil-piż tal-ġisem minn Jum 1 sa Jum 6 u mortalità, għandhom jiġu kkunsidrati fl-evalwazzjoni. Annimali moribondi jew annimali li juru sinjali ta' uġiħ jew dieqa severa għandhom jinqatlu b'mod uman (31).

Skeda ta' sperimentazzjoni tal-istudju ewlieni

25. L-iskeda sperimentali tal-analizi hija kif ġej:

— *Jum 1:* Identifika individwalment u hu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Applika 25 µL tad-dilwizzjoni xierqa tas-sustanza tat-test, il-mezz wahdu, jew il-PC (simultanja jew reċenti, skont il-politika tal-laboratorju fl-ikkunsidrati tal-paragrafi 11-15), fuq in-naħa ta' wara ta' kull widna.

— *Jiem 2 u 3:* Irrepeti l-proċedura ta' applikazzjoni li għamilt f'Jum 1.

— *Jum 4:* L-ebda trattament.

— *Jum 5:* Injetta 0,5 mL (5 mg/gurdien) ta' soluzzjoni BrdU (10 mg/mL) ġewwa l-peritonju.

— *Jum 6:* Hu nota tal-piż ta' kull annimal u ta' kwalunkwe osservazzjoni klinika. Madwar 24 siegħa (24h) wara l-injezzjoni tal-BrdU, oqtol l-annimali b'mod uman. Aqta' barra n-nodi limfatiċi awrikulari li jkunu qed inixxu minn kull widna tal-gurdien u pproċessa separatament f'ilma bil-melħ ibbaferjat bil-fosfat (PBS) għal kull annimal. Id-dettalji u d-dijagrammi tal-identifikazzjoni u d-dissezzjoni tan-noduli limfatiċi tinsab fir-referenza (17). Sabiex tkompli tissorvelja r-reazzjoni lokali tal-gilda fl-istudju ewlieni, jistgħu jiġu inkluzi parametri oħrajn bħall-ghoti ta' punti għall-eritema fil-widna jew il-kejl tal-hxuna tal-widna (miksba kemm permezz ta' gejġ tal-hxuna, kif ukoll permezz tad-determinazzjonijiet tal-piżijiet bl-immarrar tal-widna fl-awtopsja) fil-protokoll tal-istudju.

▼ **M3****It-thejjija tas-sospensjonijiet taċ-ċelloli**

26. Minn kull gurdien, tithejjija sospensjoni ta' ċellola wahdaniya ta' ċelloli tan-nodi limfatiċi (LNC — lymph node cells) maqtugħin bilaterament b'dizag-gregazzjoni mekkanika hafifa permezz ta' xibka tal-istainless steel b'malja ta' 200 micron jew permezz ta' teknika aċċettabbli oħra għall-ġenerazzjoni ta' sospensjoni ta' ċellola wahda (eż. użu ta' pestle tal-plastik li tintrema wara l-użu sabiex jifarrku n-nodi limfatiċi segwit minn mogħdija minn malja tan-najlon ta' #70). Il-proċedura għat-thejjija tas-sospensjoni LNC hija kritika f'din l-analiżi u għaldaqstant, kull operatur għandu jistabbilixxi l-hila bil-quddiem. Barra minn hekk, in-nodi limfatiċi f'annimali NC huma żgħar, għalhekk operazzjoni attenta hija importanti sabiex ikun evitat kwalunkwe effett artifiċjali fuq il-valuri SI. F'kull każ, il-volum fil-mira tas-sospensjoni LNC għandu jiġi aġġustat sa volum ottimizzat determinat (bejn wieħed u ieħor 15 mL). Il-volum ottimizzat huwa bbażat fuq l-ilhiq ta' assorbenza medja tal-grupp NC fi hdan 0,1–0,2.

Determinazzjoni tal-proliferazzjoni ċellolari (kejl tal-kontenut tal-BrdU fid-DNA ta' limfoċiti)

27. Il-BrdU titkejjel b'ELISA permezz ta' kit kummerċjali (eż. Roche Applied Science, Mannheim, Ġermanja, Numru tal-Katalogu 11 647 229 001). Fil-qosor, 100 µL tas-sospensjoni tal-LNC tiżdied mal-bjar ta' mikroplatt b'qiegh ċatt fi triplikat. Wara fissazzjoni u denaturazzjoni tal-LNC, l-antikorp kontra l-BrdU jiżdied ma' kull bir u jithalla jirreagġixxi. Sussegwentement, l-antikorp kontra l-BrdU jitneħħa bil-hasil u mbagħad, is-soluzzjoni tas-sustrat tiżdied u tithalla tipproduċi kromogen. Imbagħad titkejjel l-assorbenza ta' 370 nm b'wavelength ta' referenza ta' 492 nm. Fil-każijiet kollha, il-kundizzjonijiet tat-test tal-analiżi għandhom jiġu ottimizzati (ara paragrafu 26).

OSSERVAZZJONIJIET**Osservazzjonijiet kliniċi**

28. Kull gurdien għandu jiġi osservat b'attenzjoni mill-inqas darba kuljum għal kwalunkwe sinjal kliniku, kemm ta' irritazzjoni lokali fil-post tal-applikazzjoni jew ta' tossiċità sistemika. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati b'mod sistematiku u jinżammu rekords għal kull gurdien. Il-pjani ta' sorveljanza għandhom jinkludu kriterji sabiex jiġu identifikati mill-ewwel dawk il-ġrieden li juru tossiċità sistemika, irritazzjoni lokali eċċessiva tal-ġilda, jew tmermir tal-ġilda għall-ewtanazja (31).

Pizijiet tal-ġisem

29. Kif iddikjarat fil-paragrafu 25, il-pizijiet tal-ġisem tal-annimali individwali għandhom jitkejlu fil-bidu tat-test u fil-qatla b'mod uman skedata.

KALKOLU TAR-RIŻULTATI

30. Ir-riżultati għal kull grupp ta' trattament huma espressi bħala l-SI medja. L-SI jinkiseb billi wieħed jiddividi l-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU/gurdien f'kull grupp tas-sustanza tat-test u l-grupp tal-PC, bl-indiċi medju ta' ttikkettar tal-BrdU għall-grupp tas-solvent/VC. L-SI medju għall-VCs imbagħad ikun wieħed.

L-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU huwa definit bħala:

$$\text{Indiċi tat-tikkettar tal-BrdU} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS}_{\text{vojt}_{\text{em}}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS}_{\text{vojt}_{\text{ref}}})$$

Fejn; em = wavelength tal-emissjoni; u ref = wavelength ta' referenza.

▼ M3

31. Il-proċess tad-deċiżjoni jqijs riżultat bħala pozittiv meta $SI \geq 1,6$ (10). Madankollu, il-qawwa tar-relazzjoni tad-doża-reażzjoni, is-sinifikat statistiku u l-konsistenza tas-solvent/mezz u r-reażzjonijiet tal-PC jistgħu jintużaw ukoll sabiex wiehed jiddetermina jekk riżultat marginali (jiġifieri valur SI bejn 1,6 u 1,9) jiġix iddikjarat pozittiv (3) (6) (32).
32. Għal rispons pozittiv marginali bejn SI ta' 1,6 u 1,9, l-utenti jistgħu jkunu jridu jikkunsidraw informazzjoni addizzjonali bħar-relazzjoni doża-reażzjoni, evidenza ta' tossiċità sistemika jew irritazzjoni eċċessiva, u fejn xieraq, sinifikat statistiku flimkien ma' valuri SI sabiex jiġi kkonfermat li tali riżultati huma pozittivi (10). Għandhom jiġu kkunsidrati d-diversi karatteristiċi tas-sustanza tat-test, inkluż jekk għandhiex relazzjoni strutturali ma' sustanzi magħrufa li jgħolqu sensitizzazzjoni fil-ġilda, jekk tikkawżax irritazzjoni eċċessiva fil-ġilda tal-ġurdien, u n-natura tad-doża-reażzjoni osservata. Dawn u konsiderazzjonijiet oħrajn huma diskussi fid-dettall x'imkien ieħor f'dan id-dokument (4).
33. Il-ġbir ta' dejta fil-livell tal-ġurdien individwali jippermetti li ssir analiżi statistika għall-preżenza u l-grad ta' relazzjoni bejn id-doża u r-reażzjoni fid-dejta. Kull valutazzjoni statistika tista' tinkludi valutazzjoni tar-relazzjoni bejn id-doża u r-reażzjoni kif ukoll tqabbil aġġustat kif xieraq tal-gruppi tat-test (eż. grupp iddożat f'pari kontra tqabbil ta' kontroll ta' solvent simultanju/VC simultanju). L-analiżijiet statistiċi jistgħu jinkludu, eż. regressjoni lineari jew it-test ta' William għall-valutazzjoni tat-tendenzi tad-doża u tar-reażzjoni, u t-test ta' Dunnett għal tqabbil tal-pari. Meta jagħzel metodu xieraq għall-analiżi statistika, ir-riċerkatur għandu jkun konxju mill-inugwaljanzi possibbli tad-differenzi u problemi oħrajn relatati li jistgħu jehtieġu trasformazzjoni tad-dejta jew analiżi statistika mhux parametrika. Fi kwalunkwe każ, ir-riċerkatur jista' jehtieġ li jagħmel kalkoli tal-SI u analiżijiet statistiċi b'ċerti punti ta' dejta jew minghajrhom (li xi drabi jissejju "anomaliġi" (outliers)).

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

34. Id-dejta għandha tingħata fil-qosor f'għamla ta' tabella li turi l-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU tal-annimal individwali, l-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU medju tal-grupp/annimal, it-terminu ta' zball assoċjat tiegħu (eż. SD, SEM), u l-SI medju għal kull grupp ta' doża meta mqabbel mas-solvent/-grupp ta' kontroll tal-mezz simultanju.

Rapport tat-test

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

Sustanzi kimiċi tat-test u ta' kontroll

- dejta tal-identifikazzjoni (eż. in-numru tal-CAS u tal-KE, jekk disponibbli; is-sors; il-purità; l-impuritàjiet magħrufa; in-numru tal-lott),
- in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżikokimiċi (eż. pH, volatilità, stabbiltà, solubilità),
- jekk tahlita, il-kompożizzjoni u l-perċentwali relattivi tal-komponenti,

Solvent/mezz

- dejta tal-identifikazzjoni (purità; konċentrazzjoni, fejn xieraq; il-volum użat);
- raġuni għall-għażla tal-mezz,

▼ **M3**

Animali tat-test

- is-sors tal-ġrieden tas-CBA,
- l-istatus mikrobijologiku tal-annimali, meta jkun magħruf,
- l-ghadd u l-età tal-annimali,
- is-sors tal-annimali, il-kundizzjonijiet tal-gaġeġ, id-dieta, eċċ.,

Kondizzjonijiet tat-test

- is-sors, in-numru tal-lott u assigurazzjoni tal-kwalità tal-manifattur/dejta ta' kontroll tal-kwalità (sensittività tal-antikorp u speċifità u l-limitu ta' kxi) għall-kit tal-ELISA,
- dettalji dwar it-thejjija u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test,
- raġuni għall-ghażla tad-doża (inklużi riżultati mit-test ta' qabel l-iskrinjar, jekk ikun sar),
- il-konċentrazzjonijiet tal-mezz u tas-sustanza tat-test użati, u l-ammont totali tas-sustanza tat-test applikata,
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż it-tip/is-sors tad-dieta, is-sors tal-ilma),
- dettalji dwar l-iskedi tat-trattament u tat-tehid ta' kampjuni,
- metodi ta' kejl tat-tossicità,
- kriterji li ntuzaw sabiex l-istudji jiġu kkunsidrati pożittivi jew negattivi,
- dettalji dwar kwalunkwe devjazzjoni mill-protokoll u spjegazzjoni dwar kif id-devjazzjoni taffettwa d-disinn u r-riżultati tal-istudju,

Verifika tal-affidabilità

- sommarju tar-riżultati tal-aħħar kontroll tal-affidabilità, inkluża informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, il-konċentrazzjoni u l-mezz użati,
- PC simultanju u/jew storiku u dwar dejta ta' kontroll negattiv simultanju (solvent/mezz) għal-laboratorju li qed jagħmel it-test,
- jekk ma kienx hemm inkluż PC simultanju, id-dejta u r-rapport tal-laboratorju għall-aktar PC perijodu reċenti u rapport li jagħti dettalji dwar id-dejta storika tal-PC għal-laboratorju li tiġġustifika l-bażi għaliex ma sarx PC simultanju,

Ir-riżultati

- piżijiet individwali tal-ġrieden fil-bidu tad-dożar u mal-qatla b'mod uman skedata; kif ukoll il-medja u t-terminu ta' zball assoċjat (eż. SD, SEM) għal kull grupp ta' trattament,
- il-hin tal-bidu u tas-sinjali ta' tossicità, inkluża l-irritazzjoni tal-gilda fil-post fejn ingħatat id-doża, jekk ikun hemm, għal kull annimal,
- tabella tal-valuri tal-indiċi tat-tikkettar tal-BrdU u tal-valuri SI tal-gurdien individwali għal kull grupp ta' trattament,
- terminu ta' zball medju u assoċjat (eż. SD, SEM) għal indiċi tat-tikkettar tal-BrdU/gurdien għal kull grupp tat-trattament u r-riżultati tal-analizi ta' barra għal kull grupp ta' trattament,

▼ **M3**

— l-SI kkalkulat u kejl xieraq tal-varjabbiltà li jikkunsidra l-varjabbiltà bejn l-annimali kemm fis-sustanza tat-test kif ukoll fil-gruppi ta' kontroll,

— ir-relazzjoni bejn id-doża u r-reazzjoni,

— analizijiet statistiċi, fejn xieraq,

Diskussjoni tar-riżultati

— kumment qasir dwar ir-riżultati, l-analiżi tad-doża u r-reazzjoni, u analiżijiet statistiċi, fejn xieraq, b'konklużjoni dwar jekk is-sustanza tat-test għandhiex titqies li tikkawża s-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

LETTERATURA

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Linja Gwida tat-Test Nru 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. u Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999–1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. u Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985–997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. u Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49–59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponibbli fuq: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258–273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274–286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249–257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication Nru 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/T-MER.htm>]

▼ M3

- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. u Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129–134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Linja Gwida tat-Test Nru 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Parigi. Disponibbli fuq is-sit: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. u Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896–1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. u Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90–96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7 edizzjoni. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71–89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13–31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Linja Gwida tat-Test Nru 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Parigi. Disponibbli fuq is-sit: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. u DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. u Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195–206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. u Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83–94.
- (25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. u Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245–256.

▼ **M3**

- (26) Hayes, B.B. u Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491–506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. u Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60–68.
- (28) Vohr, H.W. u Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721–728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. u Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023–1028.
- (30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponibbli fuq is-sit: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute-tox/Tox_workshop.htm].
- (31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment Nru 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.
- (33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment Nru 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Pariġi. Disponibbli fuq is-sit: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

▼ M3

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Preciżjoni: Il-qribija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri aċċettati ta' referenza. Hija miżura tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' metodu ta' ttestjar (33).

Sustanza ta' riferiment: Sustanza sensitizzanti jew mhux sensitizzanti użata bħala standard għat-tqabbil ma' sustanza tat-test. Sustanza ta' riferiment għandu jkollha l-karatteristiċi li ġejjin: (i) konsistenti u affidabbli; (ii) similarità strutturali u funzjonali għall-klassi ta' sustanzi li jkunu qed jiġu ttestjati; (iii) karatteristiċi fiżiċi/kimiċi magħrufa; (iv) dejta ta' appoġġ dwar effetti magħrufa, u (v) potenza magħrufa fil-firxa ta' rispons mixtieq.

Negattiv falz: Sustanza tat-test identifikata hażin bħala negattiv jew mhux attiva b'metodu ta' ttestjar, meta fil-fatt hija pożittiva jew attiva (33).

Pożittiv falz: Sustanza tat-test identifikata hażin bħala pożittiva jew attiva minn test, meta fil-fatt hija negattiva jew mhux attiva (33).

Periklu: Il-potenzjal għal effett avvers għas-saħħa jew għall-ambjent. L-effett avvers jidher biss jekk hemm esponiment ta' livell suffiċjenti.

Riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor: Kejl ta' kemm il-laboratorji kwalifikati differenti, li jużaw l-istess protokoll u li jittestjaw l-istess sustanza tat-test, jistgħu jipproduċu riżultati li huma simili b'mod kwalitattiv u kwantitattiv. Ir-riproduċibbiltà bejn laboratorju u ieħor hija determinata matul il-proċessi ta' qabel il-validazzjoni u tal-validazzjoni, u tindika kemm it-test jista' jiġi trasferit b'suċċess bejn laboratorji, u din tissejjah ukoll riproduribbiltà bejn laboratorji (33).

Riproduċibbiltà intralaboratorja: Determinazzjoni ta' kemm il-persuni kwalifikati fi hdan l-istess laboratorju jista' jirnexxihom jirreplikaw ir-riżultati billi jużaw protokoll speċifiku fi żminijiet differenti. Din tissejjah ukoll riproduribbiltà fi hdan il-laboratorju (33).

Outlier: Outlier hija osservazzjoni li hija mmarkata differenti minn valuri oħrajn f'kampjun aleatorju minn popolazzjoni.

Garanzija tal-kwalità: Proċess ta' ġestjoni li permezz tiegħu huma vvalutati l-aderenza mal-istandards ta' ttestjar tal-laboratorji, ir-reqwiziti u l-proċeduri ta' żamma tar-rekords u l-precizjoni tat-trasferiment tad-dejta minn individwi li huma indipendenti minn daww li jwettqu l-ittestjar.

Affidabilità: Miżuri li bihom, metodu ta' ttestjar jista' jiġi riprodott maż-żmien, fost u bejn il-laboratorji stess, meta jwettqu l-istess protokoll. Din hija vvalutata billi tiġi kkalkolata r-riproduċibbiltà fi hdan laboratorju u bejn laboratorju u ieħor (33).

Is-sensitizzazzjoni tal-ġilda: Proċess immunologiku li jiffaċċa meta individwu suxxettibbli jkun espost b'mod topiku għal allergen kimiku ta' induzzjoni, li jipprovoka reazzjoni immuni fil-ġilda li tista' twassal għall-iżvilupp ta' sensitizzazzjoni mal-kuntatt.

Indiċi ta' Stimolazzjoni (SI): Valur ikkalkolat sabiex jivvaluta l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda ta' sustanza tat-test li huwa l-proporzjon tal-proliferazzjoni fil-gruppi ttrattati għal dak fil-grupp ta' kontroll ta' mezz simultanju.

Sustanza tat-test (li ssir referenza għaliha wkoll bħala s-sustanza kimika tat-test): Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata billi jintuża dan it-TM.

▼M4

B.52. TOSSICITÀ TA' INALAZZJONI AKUTA – METODU TA' KLASSI AKUTA TOSSIKA

DAHLA

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti ghal-Linja Gwida tat-Test (TG) 436 (2009) tal-OECD. L-ewwel TG 403 dwar inalazzjoni akuta kienet adottata fl-1981, u minn dak iż-żmien 'l hawn kienet irriveduta (ara l-kapitolu B.2 ta' dan l-Anness (1)). Żvilupp ta' metodu ta' Klassi ta' Inalazzjoni Akuta Tossika (ATC) (2) (3) (4) tqies li kien xieraq wara l-adozzjoni tal-metodu ta' ATC orali rivedut (il-kapitolu B.1 tris ta' dan l-Anness) (5). Valutazzjoni retrospettiva tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar ta' ATC ghal tossicità ta' inalazzjoni akuta wera li l-metodu kien tajjeb biex jintuża ghal finijiet ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar (6). Il-Metodu ta' Ttestjar ta' ATC ta' inalazzjoni jippermetti l-użu ta' stadji wiehed wara iehor ta' konċentrazzjonijiet immirati fissi biex tkun ipprovduta gradazzjoni ta' tossicità tal-kimika għall-ittestjar. Il-lealtà tintuża bħala punt ta' tmiem ewlieni, iżda annimali f'uġigh 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-Tossicità 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-proprietajiet 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 tossicità akuta (9). F'każ li jkun meħtieġa stimi ta' punti ta' valuri LC₅₀ 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 f'tit jinhallu 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 adattati tinkludi l-identità, l-istruttura tal-kimika u l-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ta' tossicità *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 jkun mistennija jikkawżaw uġigh u diffikultà severi, minhabba azzjonijiet korrużivi ⁽¹⁾ jew irritanti b'mod sever, m'għandhomx ikunu ttestjati b'dan il-Metodu ta' Ttestjar [ara GD 39 (8)].

⁽¹⁾ L-evalwazzjoni tal-korrużività tista' tkun ibbazata fuq gudiżżju espert billi tintuża evidenza bħal: esperjenza tal-bnedmin u tal-annimali, dejta eżistenti (*in vitro*), eż. il-kapitolu B.40 (10), B.40 bis (11) ta' dan l-anness jew TG 435 tal-OECD (12), valuri ta' pH, informazzjoni minn kimiċi simili jew dejta pertinenti oħra.

▼ M4

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Huwa l-prinċipju tat-test li abbażi ta' proċedura pass pass, tinkiseb informazzjoni suffiċjenti dwar it-tossiċità ta' inalazzjoni akuta tal-kimika għall-ittestjar matul perjodu ta' espożizzjoni ta' 4 sigħat biex tkun tista' ssir klassifikazzjoni. Jistgħu japplikaw durati oħra ta' espożizzjoni biex jaqdu għanjiet regolatorji speċifiċi. F'kull wiehed 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 jithalla jsir gudizzju dwar it-tossiċità akuta tal-kimika għall-ittestjar. Jekk tkun ipprovduta evidenza li sess wiehed ikun aktar suxxettibbli mill-iehor, 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-sugġett 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 żgħażaġh f'saħħithom ta' razez li komu-nement 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 żgħażaġh ta' 8 sa 12-il ġimgħa fl-età, u l-piżijiet tal-ġisem għandhom ikunu ta' $\pm 20\%$ tal-piż medju għal kull sess ta' kull animal 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, minhabba li dan inaqqas it-tensjoni kkawzata bl-introduzzjoni għall-ambjent il-ġdid.

Trobbija tal-annimali

10. It-temperatura tal-kamra taż-żamma tal-annimali tal-esperimenti għandha tkun $22 \pm 3^\circ\text{C}$. 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 generalment għandhom jitqieghdu f'gaġġa fi gruppi skont is-sess u l-konċentrazzjoni, iżda l-ghadd ta' annimali għal kull gaġġa m'għandux ifixkel l-osservazzjoni ċara ta' kull animal u għandu jimminimizza t-telf minhabba kannibalizmu u ġlied. Meta annimali jkollhom ikunu esposti mill-immieher biss, jista' jkun jehtigilhom jidraw it-tubi ta' trazzin. It-tubi ta' trazzin m'għandhomx jimponu tensjoni

▼ M4

fizika, termali u ta' immobilizzazzjoni bla bżonn fuq l-annimali. It-trażżin jista' jaffettwa punti ta' tmiem fiżjoloġiċi bħat-temperatura tal-ġisem (iper-termja) 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 jithallewx jiffiltraw l-aerosol tat-test mal-pil ta' shabhom fil-gaġġa. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali u ċertifikati mil-laboratorju, hlief matul espożizzjoni, flimkien ma' provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb municiipali. 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-ghan tat-test għandhom jitqiesu fl-għażla tal-kamra tal-inalazzjoni. Il-mod preferut ta' espożizzjoni huwa mill-imnieher biss (liema frażi tinkludi r-ras biss, l-imnieher biss jew il-geddum biss). Espożizzjoni mill-imnieher 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 ahjar 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-imnieher 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 hin ta' ekwilibrizzjoni. Jistgħu jkunu meħtieġa espożizzjonijiet li jdumu aktar biex jitharsu 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 jithallewx jibilgħu kimika għall-ittestjar minhabba tindif ta' shabhom fil-gaġġa. M'għandux jingħata għalf matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Jista' jingħata ilma matul espożizzjoni kollha mill-ġisem kollu.
13. L-annimali jkunu esposti għall-kimika għall-ittestjar bħala gass, fwar, aerosol, jew tahlita tagħhom. L-istat fiziku li jkollu jiġi ttestjat jiddependi mill-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar, il-konċentrazzjoni magħżula, u/jew il-forma fizika 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 espussivi.

Distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli

14. It-tehid tad-daqs tal-particelli għandu jsir għall-aerosols kollha u għall-fwar li jista' jikkondensa biex jifforma l-aerosols. Biex jithalla 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, dhahen tal-metall jistgħu jkunu anqas minn dan l-istandard, u particelli, fibri u materjali igroskopiċi mimlijin (li jikbru fid-daqs fl-ambjent niedi tas-sistema respiratorja) jistgħu jaqbużu dan l-istandard.

▼ **M4****Preparazzjoni ta' kimika għall-ittestjar f'vejjikolu**

15. Jista' jintuża vejjikolu biex jiġġenera konċentrazzjoni u daqs ta' partiċelli xierqa tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera. Bħala regola, l-ilma għandu jingħata preferenza. Materjal ta' partiċelli jista' jkun soġġett għal proċessi mekkaniċi biex tinkiseb id-distribuzzjoni ta' daqs mehtieg ta' partiċelli, iżda għandha tingħata attenzjoni li ma tithassarx jew tinbidel il-kimika għall-ittestjar. F'kazijiet fejn proċessi mekkaniċi jitqiesu li jkunu bidlu l-kompożizzjoni tal-kimika għall-ittestjar (eż. temperatura estrema minn thin eċċessiv minhabba 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 mehtieg li jkunu ttestjati materjali mrammla mhux nutrittivi li jkunu fformulati apposta biex ma jkunux jistgħu jittiehdu man-nifs. Għandu jintuża test ta' attrizzjoni biex jintwera li partiċelli li jistgħu jittiehdu man-nifs ma jkunux prodotti meta jkun ittrattat materjal granulari. Jekk test ta' attrizzjoni jipproduċi partiċelli li jkunu jistgħu jittiehdu man-nifs, għandu jsir test għat-tossiċità li tittiehdu man-nifs.

Annimali tal-kontroll

16. Ma jkunx mehtieg 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' tehid 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 mehtieg kontroll ta' vejjikolu.

MONITORAĠĠ TAL-KONDIZZJONIJET 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-gdid fi kmamar għall-imnieher biss f'kazijiet fejn flux tal-arja mis-sistema ta' espożizzjoni ma jkunx adegwat biex jipprovdi flux dinamiku ta' atmosfera tal-kimika għall-ittestjar. Hemm metodoloġiji preskritti li jistgħu jintużaw biex jintwera li inalazzjoni mill-gdid ma ssirx skont il-kundizzjonijiet operattivi magħżula (8) (15). Konċentrazzjoni ta' ossiġenu għandha tkun mill-anqas ta' 19 % u konċentrazzjoni ta' diossidu tal-karbonju m'għandhiex tkun aktar minn 1 %. Jekk ikun hemm raġuni biex wiehed jemmin li dawn l-istandards ma jkunux jistgħu jintlaħqu, konċentrazzjonijiet ta' ossiġenu u ta' diossidu tal-karbonju għandhom jitkejlu.

Temperatura tal-kamra u umdità relattiva

18. It-temperatura tal-kamra għandha tinzamm għall- 22 ± 3 °C. L-umdità relattiva fiż-zona fejn l-annimali jiehdu n-nifs, għal espożizzjonijiet kemm mill-imnieher 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 tinzamm fil-firxa ta' 30 % sa 70 %, iżda din jew ma tkunx tista' tintlaħaq (eż. meta jkunu ttestjati tahlitiet ibbazati fl-ilma) jew ma tkunx tista' titkejjel minhabba interferenza minn kimika għall-ittestjar mal-metodu tal-ittestjar.

▼ M4

Kimika għall-ittestjar: konċentrazzjoni nominali

19. Kull meta jkun fattibbli, il-konċentrazzjoni nominal tal-kamra ta' espożizzjoni għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Il-konċentrazzjoni nominali hija l-massa ġġenerata ta' kimika għall-ittestjar diviża bil-volum totali ta' arja li tkun għaddiet mis-sistema tal-kamra. Il-konċentrazzjoni nominali ma tintużax biex tikkaratterizza l-espożizzjoni tal-annimali, iżda tintuża bħala paragun tal-konċentrazzjoni nominali, u l-konċentrazzjoni attwali tagħti indikazzjoni tal-effiċjenza ta' generazzjoni tas-sistema tal-ittestjar, u, għalhekk, tista' tintuża biex jinkixfu problemi ta' generazzjoni.

Kimika għall-ittestjar: konċentrazzjoni attwali

20. Il-konċentrazzjoni attwali hija l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fiż-żona fejn l-annimali jiehdu n-nifs f'kamra tal-inalazzjoni. Konċentrazzjonijiet attwali jistgħu jinkisbu jew b'metodi speċifiċi (eż. tehid 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 wiehed jew għal aerosols ta' likwidi ta' volatilittà baxxa u għandu jkun appoġġat minn karatterizzazzjonijiet adattati ta' qabel l-istudju speċifiċi għall-kimika għall-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' aerosols tat-trab b'hafna komponenti tista' wkoll tkun iddeterminata b'analizi gravimetrika. Iżda din tehtiegħ 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 mehtiegħa 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 jissublimaw, għandu jintwera li l-fażijiet kollha kienu ngabru 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 wiehed 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 jinbada 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: hin ta' ritenzjoni u erja relattiva fl-ogħla livell, piż molekulari minn spettrometrija tal-massa jew minn analiżi kromatografika ta' gass, jew minn stimuli 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 tinzamm kemm prattikabilment kostanti u tkun immonitorjata kontinwament u/jew kull tant skont il-metodu ta' analiżi. Meta jintuża t-tehid ta' kampjuni kull tant, għandhom jittiehdu kampjuni tal-atmosfera tal-kamra mill-anqas darbtejn għal studju ta' erba' sigħat. Jekk dan ma jkunx jista' jsir minhabba rati limitati ta' fluss ta' arja jew konċentrazzjonijiet baxxi, ikun jista' jingabar kampjun wiehed tul il-perjodu kollu ta' espożizzjoni. Jekk isehh 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 $\pm 10\%$ għal gassijiet u fwar, u b'mhux aktar minn $\pm 20\%$ għal aerosols likwidi jew solidi. L-ekwilibrizzjoni ta' hin ma' kamra (t_{95}) għandha tkun ikkalkulata u rreġistrata. Id-durata ta' espożizzjoni tkopri l-hin li fih il-kimika għall-ittestjar tkun iġġenerata u din tqis il-hinijiet mehtiegħa biex jinkiseb t_{95} . Gwida għal stima ta' t_{95} tinsab f'GD 39 (8).

▼ M4

23. Għal kull tahlita kumplessa hafna magħmula minn fwar/gassijiet u aerosols (eż. atmosferi ta' kombustjoni u kimiċi għall-ittestjar imhaddmin 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) wahda bħala indikatur, normalment is-sustanza attiva prinċipali fit-tahlita, ta' kull fażi (fwar/gass u aerosol). Meta l-kimika għall-ittestjar tkun tahlita, il-konċentrazzjoni analitika għandha tkun irrap-purtata għat-tahlita totali u mhux biss għall-ingredjenti attivi 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 jintuza impattur kaskata jew strument alternattiv bħall-ghodda 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' jintuza tul l-istudju kollu. It-tieni mezz, bħal filtru gravimetriku jew impinger/gas bubbler, għandu jintuza flimkien mal-istrument primarju biex jikkonferma l-effiċjenza tal-istrument primarju fil-għbir. Il-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi tad-daqs ta' partiċelli għandha tkun fil-limiti raġjonevoli tal-konċentrazzjoni tal-massa miksuba b'analizi b'filtru [ara GD 39 (8)]. Jekk tkun tista' tintwera ekwivalenza fil-fażi bikrija tal-istudju, f'dak il-każ kejljiet ta' konferma ulterjuri jistgħu jithallaw barra. Għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, għandhom jittiehdu miżuri li jimminimizzaw dejta inkonklussiva li tista' twassal għal tliegħa ta' ripetizzjoni ta' espożizzjoni. Tehid 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 imhallta (ara l-paragrafu 14).

PROCEDURA

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-imnieher biss, perjodi massimi ta' espożizzjoni jistgħu jkunu aġġustati biex timaqqas diffikultà speċifika għal speċi partikolari. Il-livell ta' konċentrazzjoni li għandu jintuza bħala d-doża tal-bidu jintgħażel minn wiehed minn erba' livelli fissi u l-livell ta' konċentrazzjoni tal-bidu għandu jkun dak li l-aktar probabbli jipproduċi tossiċità f'xi annimali dozati. L-iskemi ta' ttestjar għal gassijiet, fwar u aerosols (inklużi fl-Appendiċijiet 2-4) jirrapprezentaw 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 issewgi l-vleġġ 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 raġjonevoli 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 tithalla ssir l-osservazzjoni ta' tossiċità mdewma. L-intervall ta' żmien jista' jkun aġġustati skont il-każ, eż. f'każ ta' risponsi inkonklusivi.

▼ M4

Test ta' limitu

27. It-test ta' limitu jintuza meta l-kimika għall-ittestjar tkun maghrufa jew mistennija li tkun kważi mhux tossika, jiġifieri li tislet rispons tossiku 'l fuq biss mill-konċentrazzjoni regolatorja ta' limitu. Informazzjoni dwar it-tossicità tal-kimika għall-ittestjar tista' tinkiseb minn tagħrif dwar sustanzi ttestjati simili jew minn tahlitiet 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-tossicità tagħha, jew fejn il-kimika għall-ittestjar tkun mistennija li tkun tossika, għandu jsir it-test ewlieni [għwida 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' jittiehed 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' jittiehed 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 esplozivi, 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.

OSSERVAZZIONIJET

29. L-annimali għandhom ikunu osservati klinikament sikwit matul il-perjodu ta' espożizzjoni. 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' tossicità jidhru u jgħibu huma importanti, l-aktar jekk ikun hemm tendenza li sinjali ta' tossicità jdumu ma jidhru. L-osservazzjonijiet kollha jiġu rreġistrati sistematikament b'reġistri individwalment miżmumin għal kull annimal. L-annimali li jinstabu li jkunu f'kundizzjoni moribonda u annimali li juru ugiġh 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 ezamijiet għal sinjali kliniċi ta' tossicità biex meta jidhru ftit għall-bidu u jkun hemm bidliet respiratorji li jgħaddu malajr, li jiġu minn proċedura ta' espożizzjoni, wiehed ma jhux żball u jaħsihom effetti relatati ma' trattament. Għandhom jitqiesu l-prinċipji u l-kriterji miġburin fil-qosor fid-Dokument ta' Għwida dwar il-Punt tat-Tmiem b'Mod Uman (7). Meta annimali jinqatlu għal raġunijiet umani jew jinstabu mejta, il-hin tal-mewt għandu jiġi rreġistrat b'mod preċiż kemm jista' jkun.

▼ M4

30. Osservazzjonijiet mal-ġenb tal-gaġġa għandhom jinkludu bidliet fil-ġilda u l-pil, l-għajnejn u l-membrani 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 sistemi għandu jkun innotat. Attenzjoni għandha tkun diretta għal osservazzjonijiet ta' tregħid, konvulzjonijiet, tibżiq, dijarea, letargija, rqad u koma. Il-kejl ta' temperaturi 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 animal għandhom jiġu rreġistrati 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-hin 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 haġġin jintiznu 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 jitnehhew 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 animal mejjet, l-annimal għandu jtkessah (mhux iffriżat) f'temperaturi baxxi biżżejjed biex tkun imminimizzata awtolizi. Awtopsji għandhom isiru malajr kemm jista' jkun, normalment f'jum jew tnejn. Il-bidliet patoloġiċi makroskopici kollha għandhom jiġi rreġistrati għal kull animal b'attenzjoni partikolari għal kull bidla fis-sistema respiratorja.
33. Eżaminijiet 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 haġġin 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 igroskopici għall-ittestjar.

DEJTA U RAPPORTAR**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-hin tal-mewt ta' kull animal, deskrizzjoni u kemm jiehdu żmien effetti tossiċi u riversibbiltà, u sejbiet minn awtopsji.

▼ **M4****Rapport tat-test**

35. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja, skont il-każ:

Annimali tat-test u trobbija

- Deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, inkluż: għadd (jew bidla fl-għadd) tal-annimali għal kull gaġġa, materjal għall-irqad, temperatura ambjentali u umdità relattiva, fotoperjodu u identifikazzjoni tad-dieta;
- Speċi/razza użata u ġustifikazzjoni għall-użu ta' speċi minbarra l-far;
- Għadd, età u sess tal-annimali;
- Metodu ta' każwalità;
- Dettalji tal-kwalità tal-ikel u tal-ilma (inkluż tip ta' dieta/sors, sors tal-ilma);
- Deskrizzjoni ta' kull kondizzjonament qabel it-test, inklużi dieta, kwarantina u trattament għall-mard;

Kimika għall-ittestjar

- Natura fiżika, purezza, u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fiżikokimiċi (inkluża isomerizzazzjoni).
- Dejta ta' identifikazzjoni u n-Numru tar-Registru 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 omogenea tat-test;
- Differenza ta' pressjoni (pożittiva jew negattiva);
- Portijiet ta' espożizzjoni għal kull kamra (imnieher 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 (imnieher biss), jew toqol tal-annimali/kamra (il-ġisem kollu);
- Informazzjoni dwar it-tagħmir użat għall-kejl tal-ossigenu u tad-dijossidu tal-karbonju, jekk applikabbli;

▼ **M4**

- Hin 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-zona tal-inalazzjoni tal-annimali; għal tahlitiet tat-test li jipproduċu forum fiżiċi eteroġenji (gassijiet, fwar, aerosols); kull waħda tista' tkun analizzata separatament;
- Il-konċentrazzjonijiet kollha tal-arja għandhom ikunu rrapportati f'unitajiet ta' massa (eż. mg/l, mg/m³, eċċ.); unitajiet ta' volum (eż. ppm, ppb) jistgħu wkoll ikunu rrapportati f'parenteżi;
- Distribuzzjoni tad-daqs tal-particelli, 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' particelli.

Kundizzjonijiet tat-test

- Dettalji tal-preparazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, inklużi dettalji ta' kull proċedura użata biex jitnaqqas id-daqs ta' particelli ta' sustanzi jew biex ikunu ppreparati soluzzjonijiet tal-kimika għall-ittestjar. F'każijiet fejn il-proċessi mekkanici 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-tehid 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' particelli, inklużi dejta ta' gbir ta' kampjuni analitiċi, distribuzzjoni tad-daqs ta' particelli 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);
- Pizijiet individwali ta' kull ġisem ta' annimali miġburin f'jiem ta' studju, data u hin tal-mewt jekk qabel l-ewtnasja skedata; kemm ikun għadda żmien meta jfaqqgħu sinjali ta' tossiċità, u jekk dawn kinitx reversibbli għal kull annimal;

▼ **M4**

— Sejbiet minn awtopsji u sejbiet istopatoloġiċi għal kull animal, jekk disponibbli;

— Il-klassifikazzjoni tal-kategorija CLP u l-valur ta' limitu LC₅₀;

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

— Għandha ssir enfazi 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 jiġiharsu;

— Il-konsistenza tal-metodi użati biex ikunu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet nominali u attwali, u r-relazzjoni tal-konċentrazzjoni attwali mal-konċentrazzjoni nominali għandhom ikunu inkluzi fil-valutazzjoni globali tal-istudju;

— Il-kawża probabbli tal-mewt u l-modalità predominanti ta' azzjoni (sistema versus lokali) għandhom ikunu indirizzati;

— Għandha tingħata spjegazzjoni jekk kienx hemm hteġa 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' Tnien b'Mod Uman (7).

LETTERATURA:

- (1) Il-Kapitolu B.2 ta' dan l-Anness, Tossicità Akuta (Inalazzjoni).
- (2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlegel 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 Schlegel E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.
- (4) Diener W and Schlegel E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 1: 129-134.
- (5) Il-Kapitolu B.1 tris ta' dan l-Anness, Tossicità 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 (GU L 353, 31.12.2008, p. 1).

▼M4

- (10) Il-Kapitolu B.40 ta' dan l-Anness: Korruzzjoni tal-Ġilda In Vitro: Test ta' Reżistenza Elettrika Transkutanea (TER).
- (11) Il-Kapitolu B.40 bis ta' dan l-Anness: Korruzzjoni tal-Ġilda In Vitro: Test Mudell tal-Ġilda Umana.
- (12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.
- (15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167
- (16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼ **M4**

Appendiċi 1

DEFINIZZJONI

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

▼ **M4***Appendiċi 2***Proċedura li għandha tkun segwita minn kull wahda 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.

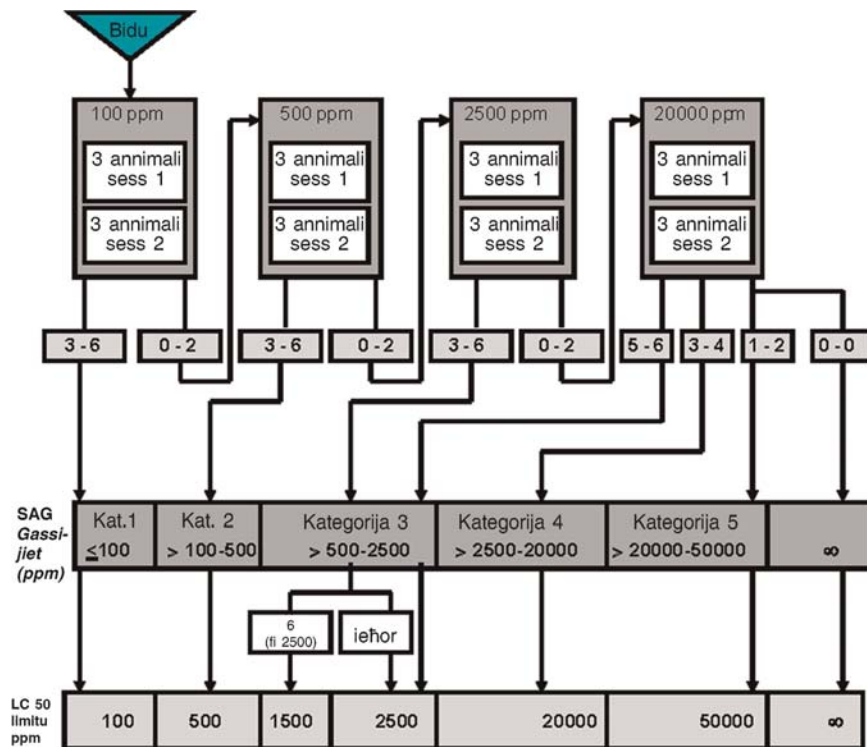
⁽¹⁾ Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizzata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossiċità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼ **M4**

Appendiċi 2a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

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



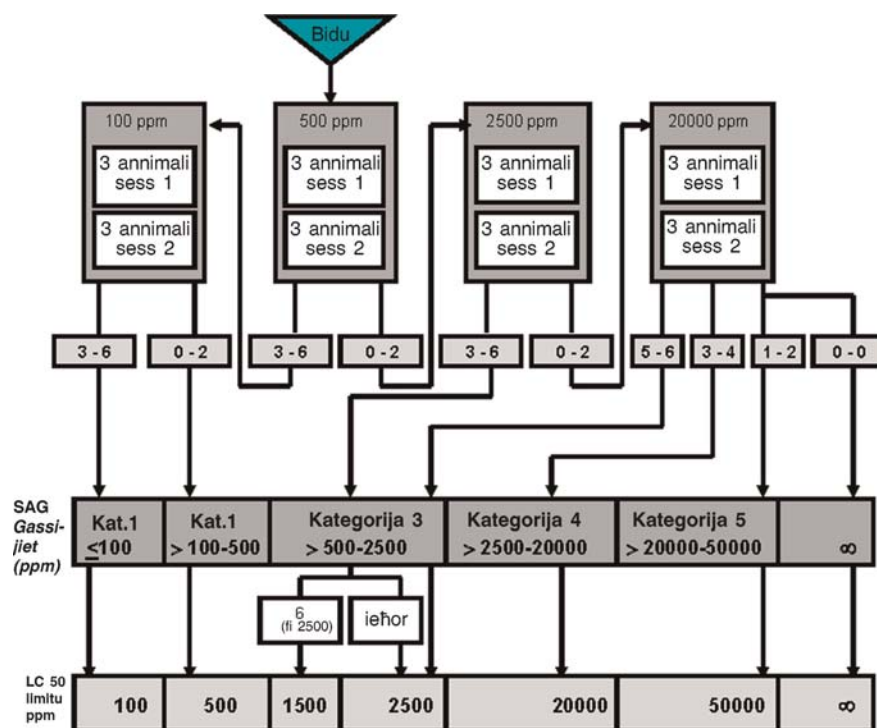
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞ : mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼ **M4**

Appendiċi 2b

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 500 ppm/4h għall-gassijiet



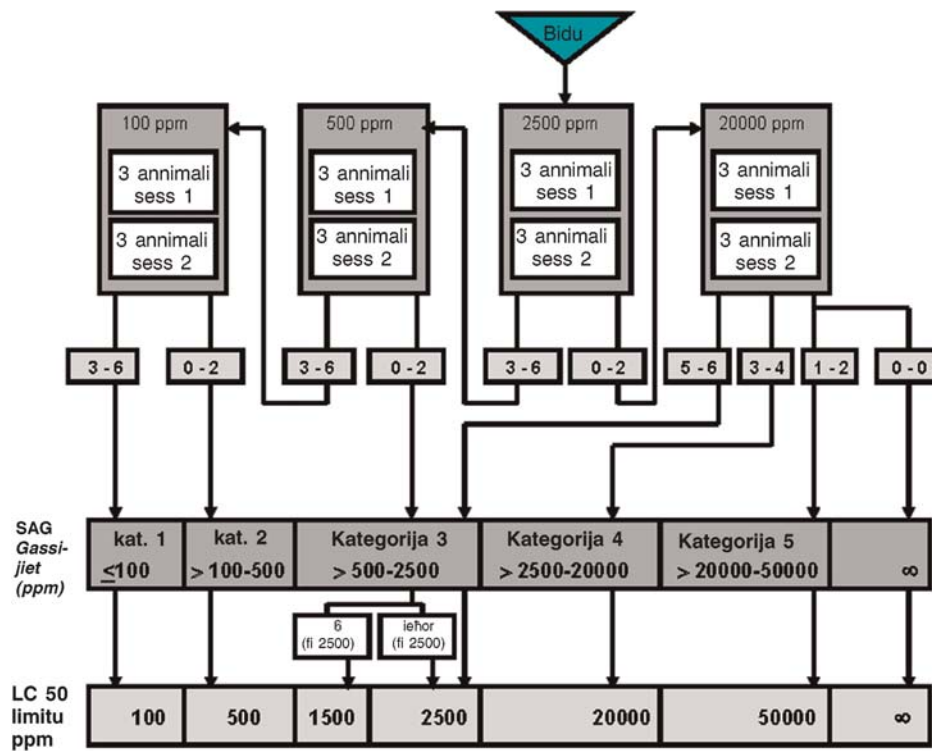
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 animali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' animali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼ **M4**

Appendiċi 2c

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 2 500 ppm/4h għall-gassijiet



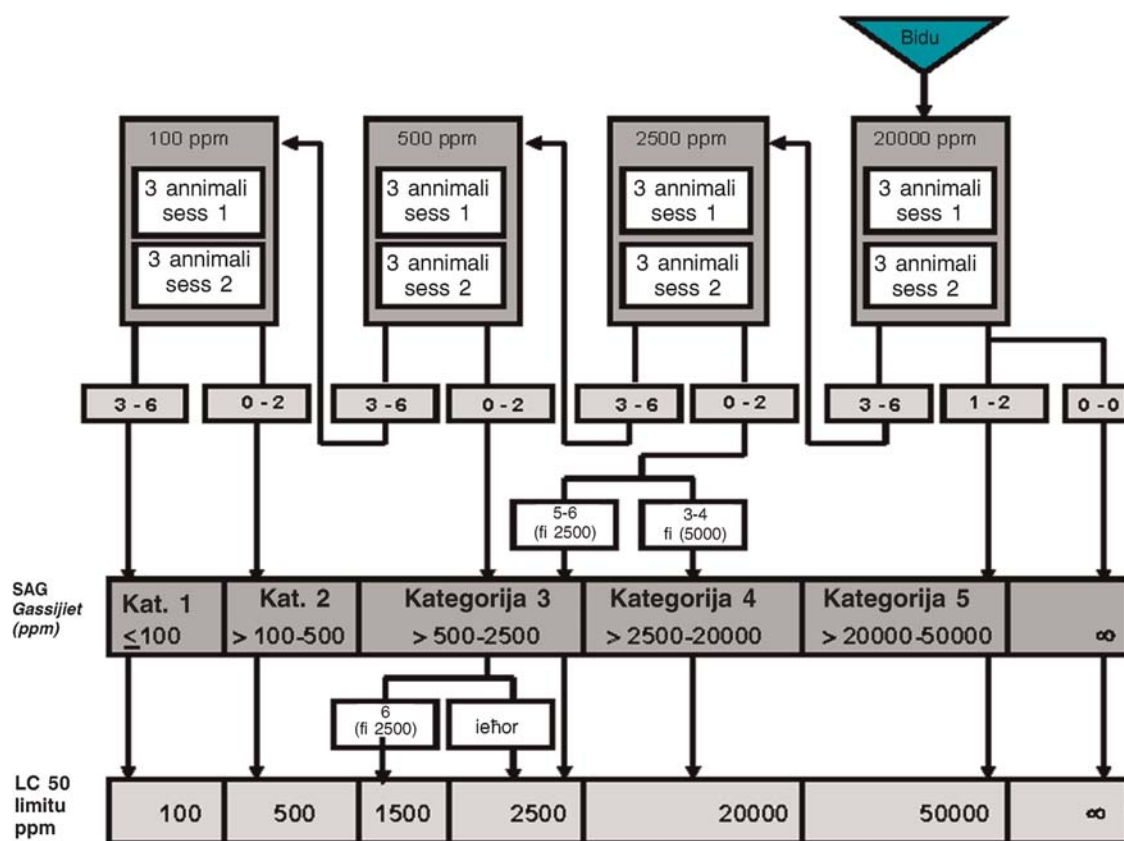
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼ **M4**

Appendiċi 2d

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 20 000 ppm/4h għall-gassijiet



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

▼ **M4***Appendiċi 3***Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għall-fwar (mg/l/4h)**Rimarki ġenerali ⁽¹⁾

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'dan l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 3a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,5 mg/l

Appendiċi 3b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 2,0 mg/l

Appendiċi 3c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 10 mg/l

Appendiċi 3d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 20 mg/l

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

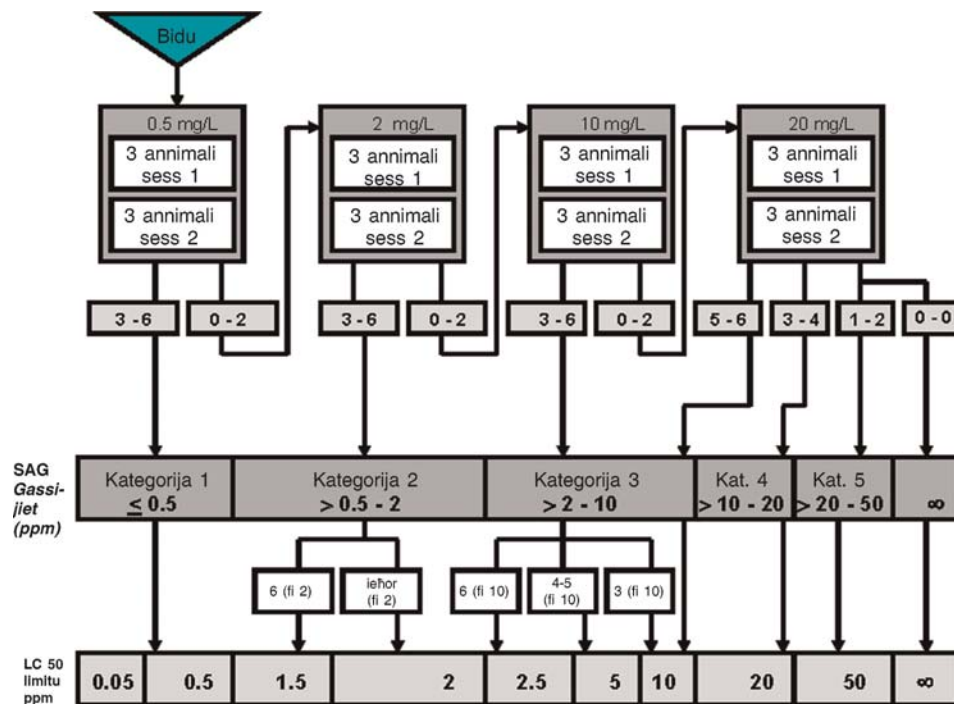
⁽¹⁾ Fit-tabelli li ġejjin qed issir referenza għall-GHS (Sistema Globali Armonizzata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossicità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼ **M4**

Appendiċi 3a

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

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

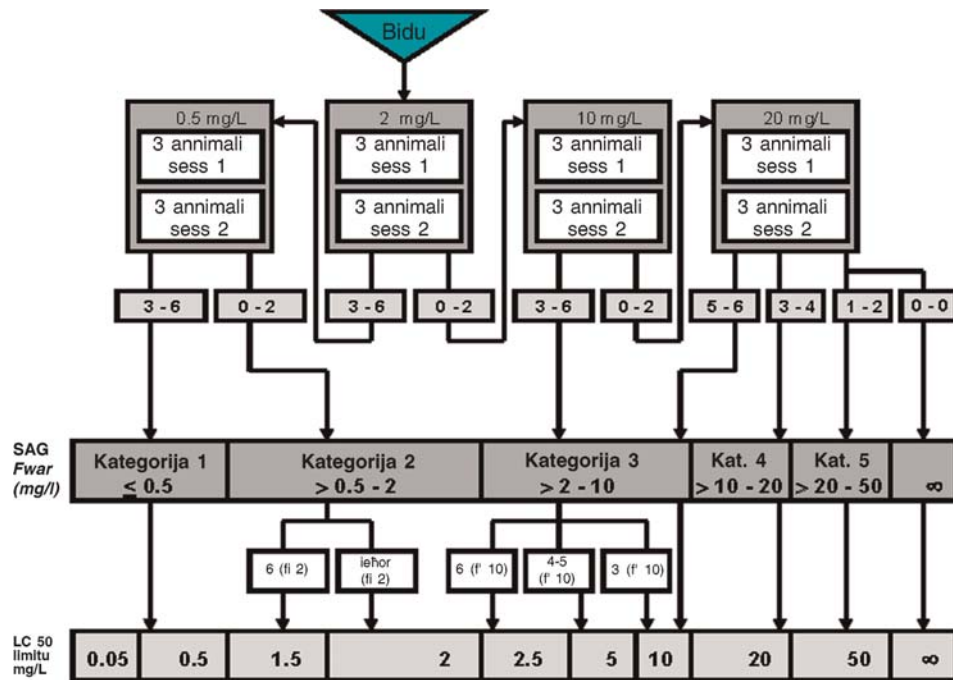


▼ **M4**

Appendiċi 3b

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 2 mg/L/4h għall-fwar



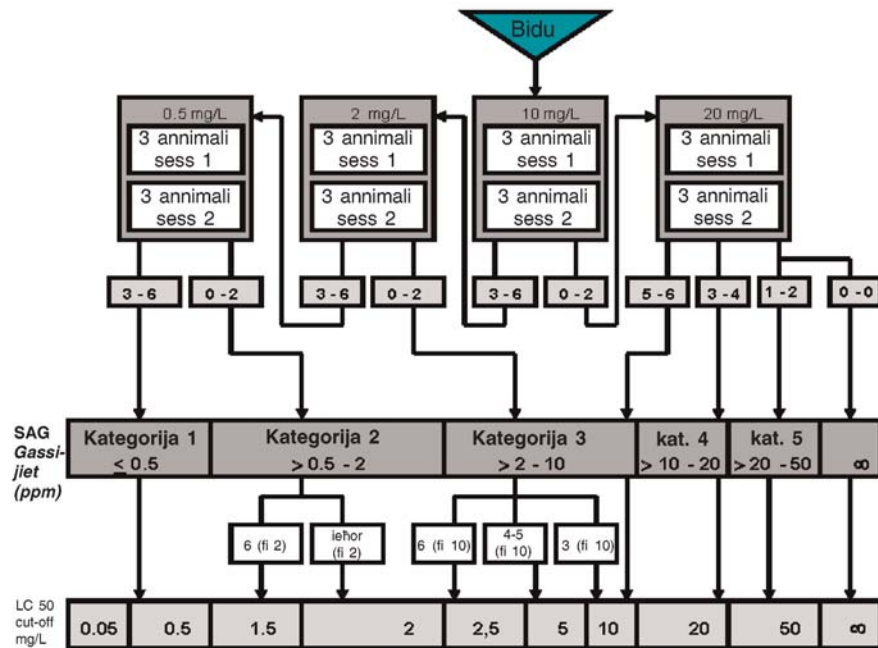
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 animali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' animali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼ **M4**

Appendiċi 3c

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

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



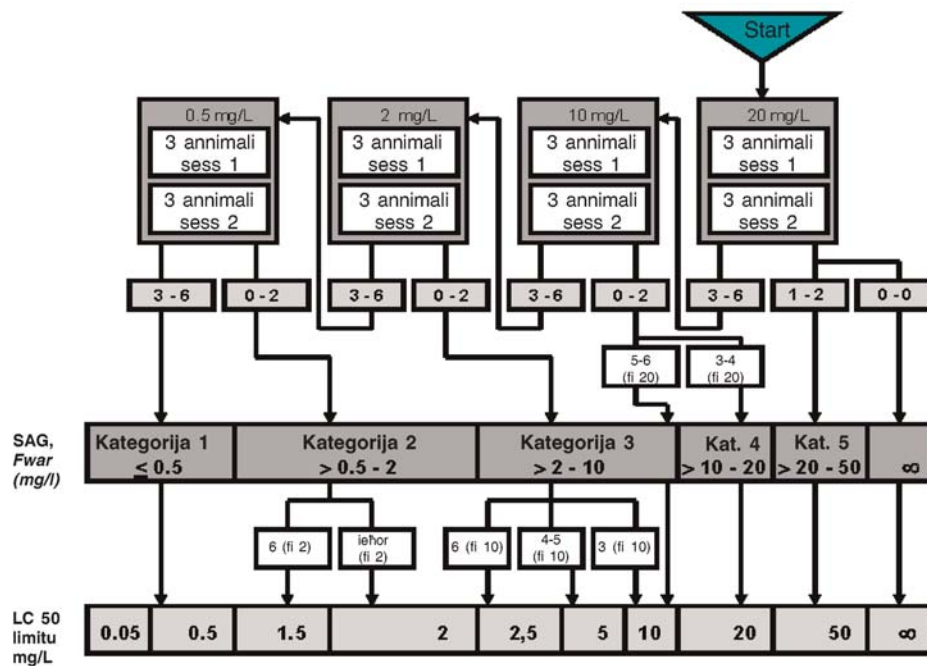
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 animali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' animali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 20000 ppm/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼ **M4**

Appendiċi 3d

Tossiċità ta' Inalazzjoni Akuta

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 20 mg/L/4h għall-fwar



- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 annimali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' annimali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi ≥ 50 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼ M4*Appendiċi 4***Proċedura li għandha tkun segwita minn kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-bidu għal aerosols (mg/l/4h)***Rimarki ġenerali ⁽¹⁾*

Għal kull konċentrazzjoni tal-bidu, l-iskemi rispettivi ta' ttestjar kif inklużi f'dan l-Appendiċi jagħtu profil tal-proċedura li għandha tkun segwita.

Appendiċi 4a: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,05 mg/l

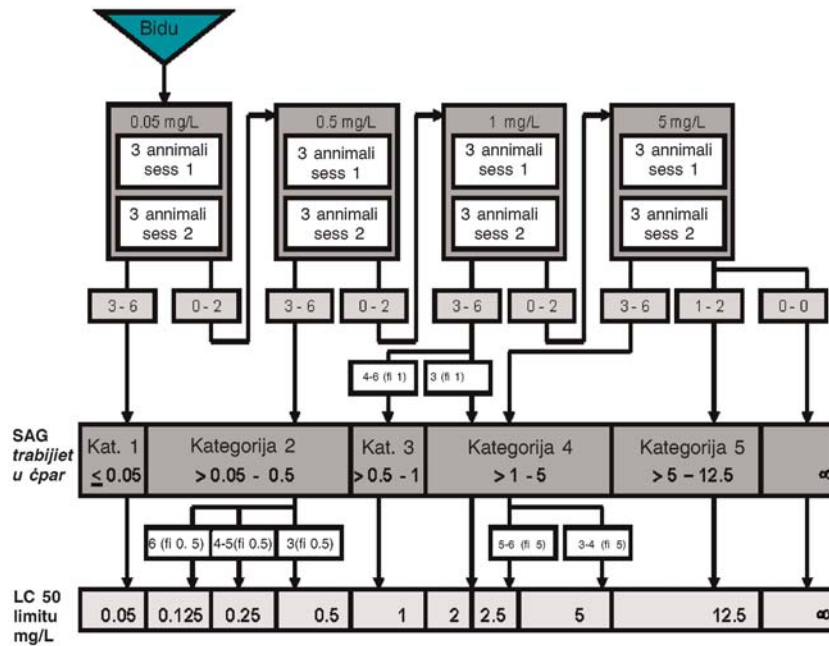
Appendiċi 4b: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 0,5 mg/l

Appendiċi 4c: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 1 mg/l

Appendiċi 4d: Il-konċentrazzjoni tal-bidu tkun ta' 5 mg/l

Skont kemm ikun l-ġhadd 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 Armonizzata ta' Klassifikazzjoni u Tikkettar ta' Kimiċi GHS). L-ekwivalenti tal-UE huwa r-Regolament (KE) Nru 1272/2008. Fil-każ ta' Inalazzjoni Akuta ta' Tossicità, ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 (9) ma jimplimentax il-Kategorija 5.

▼ **M4***Appendiċi 4a***Tossiċità ta' inalazzjoni akuta****Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 0,05 mg/L/4h għall-fwar**

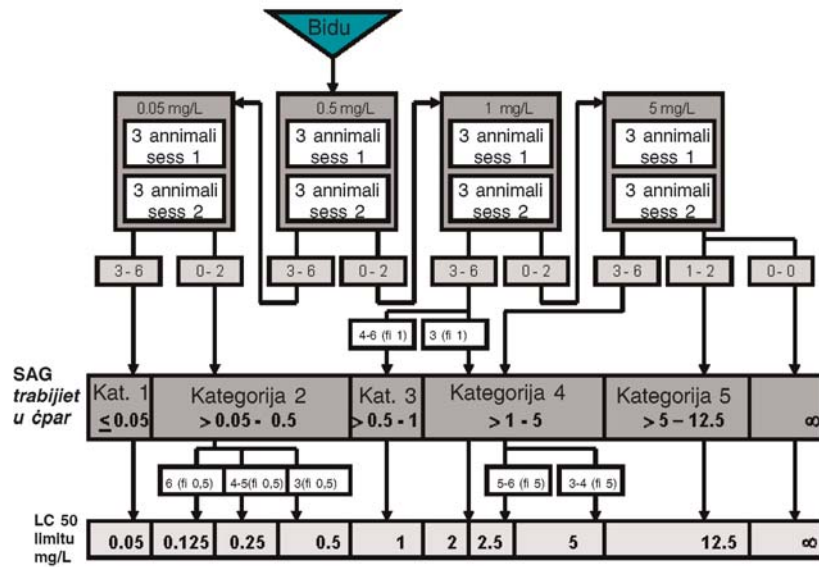
- 3 ♂ + 3 ♀, jew 6 animali tas-sess aktar suxxettibbli jintużaw għal kull stadju
- 0-6: Għadd ta' animali moribondi jew mejtin/konċentrazzjoni ttestjata
- SAG: Sistema Armonizzata Globalment
- ∞: mhux ikklassifikat
- Ittestjat fi 12.5 mg/L/4h: Ara d-Dokument ta' Gwida 39 (8)

▼ **M4**

Appendiċi 4b

Tossiċità ta' inalazzjoni akuta

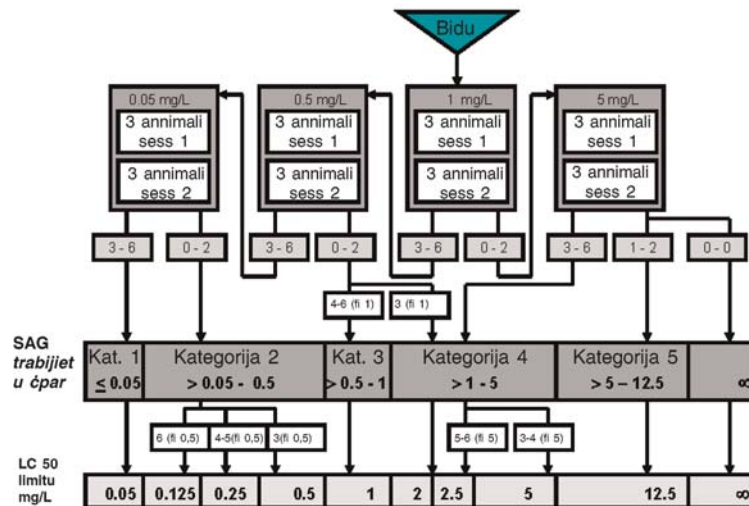
Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 0,5 mg/L/4h għall-aerosoli



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

▼ **M4***Appendiċi 4c***Tossiċità ta' inalazzjoni akuta**

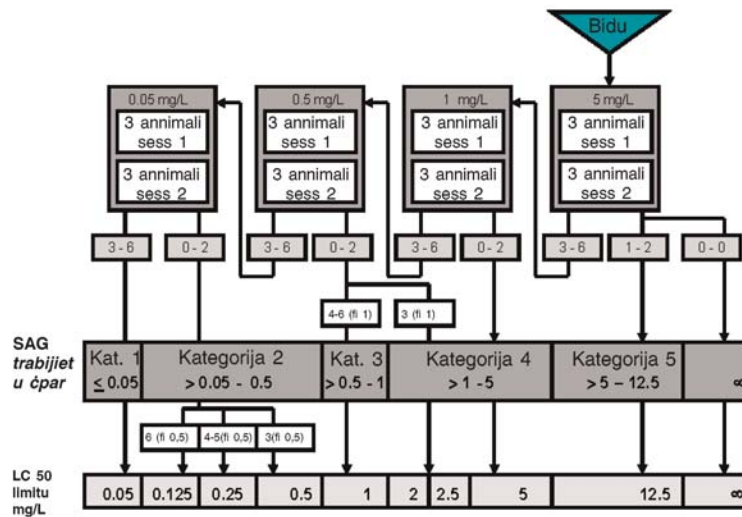
Proċedura testwalib'konċentrazzjonital-bidu ta' 1 mg/L/4h għall- aerosoli



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

▼ **M4***Appendiċi 4d***Tossiċità ta' inalazzjoni akuta**

Proċedura testwali b'konċentrazzjoni tal-bidu ta' 5 mg/L/4h g' hall-aerosoli



▼ M5

B.53. STUDJU DWAR IN-NEWROTOSSICITÀ TAL-IŻVILUPP

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar it-Testijiet (TG) tal-OECD Nru 426 (2007). F'Ġunju 1995 f'Kopenhagen, Grupp ta' Hidma tal-OECD dwar it-Tossicità Riproduttiva u tal-Iżvilupp thaddet dwar il-htiega li jiġu aġġornati l-linji gwida eżistenti tal-OECD dwar it-testijiet għat-tossicità riproduttiva u tal-iżvilupp, u l-iżvilupp ta' linji gwida godda għall-punti ahħarin li għadhom mhumieks koperti (1). Il-grupp ta' hidma rrakkomanda li l-linja gwida dwar it-testijiet għan-newrotossicità tal-iżvilupp għandhom jinkitbu fuq il-bażi ta' linja gwida tal-EPA tal-Istati Uniti, li minn dak iż-żmien 'l hawn għet riveduta (2). F'Ġunju 1996, saret it-tieni laqgħa ta' konsultazzjoni f'Kopenhagen biex is-Segretarjat jiġi pprovdut bi gwida fuq ir-riżultat ta' linja gwida ġdida dwar it-testijiet dwar in-newrotossicità tal-iżvilupp, inkluzi l-elementi ewlenin, eż., dettalji dwar l-għażla tal-ispeċi ta' annimal, il-perjodu ta' dożaġġ, il-perjodu ta' ttestjar, il-punti ahħarin li għandhom jiġu vvalutati, u l-kriterji għall-evalwazzjoni tar-riżultati. Fl-1998 għet ippubblikata linja gwida tal-Istati Uniti dwar valutazzjoni tar-riskju ta' newrotossicità (3). F'Ottubru 2000 l-ewwel saret Laqgħa ta' Konsultazzjoni tal-Esperti tal-OECD u mbagħad wara sar Workshop tal-Istitut tax-Xjenza tar-Riskji tal-ILSI u fl-2005 saret laqgħa ta' konsultazzjoni tal-esperti f'Tokjo. Dawn il-laqgħat saru biex jiġu diskussi l-kwistjonijiet xjentifiċi u tekniċi relatati mal-linja gwida kurrenti dwar it-testijiet u r-rakkomandazzjonijiet mil-laqgħat (4)(5)(6)(7) ġew ikkunsidrati fl-iżvilupp ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Iktar informazzjoni dwar il-kondotta, l-interpretazzjoni u t-terminologija użata għal dan il-metodu ta' ttestjar tista' tinkiseb mid-Dokumenti ta' Gwida tal-OECD Nru 43 dwar l-"Ittestjar u l-Valutazzjoni tat-Tossicità Riproduttiva" (8) u Nru 20 dwar l-"Ittestjar tan-Newrotossicità"(9).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

2. Hemm numru ta' sustanzi kimiċi li huma magħrufin li jipproduċu effetti newrotossici tal-iżvilupp fil-bniedem u speċi oħrajn (10)(11)(12)(13). Id-determinazzjoni tal-potenzjal għan-newrotossicità tal-iżvilupp jaf tkun meħtieġa biex jiġu vvalutati u evalwati l-karatteristiċi tossiċi ta' sustanza kimika. L-istudju dwar in-newrotossicità tal-iżvilupp huma mfasslin sabiex jipprovdut dejta, inkluzi karatterizzazzjonijiet tar-rispons għad-doża, dwar l-effetti funzjonali u morfoloġiċi potenzjali fuq is-sistema nervuża fi żvilupp tal-ulied li jistgħu jfegġu minn esponiment fl-utru u kmieni fil-hajja.
3. Studju dwar in-newrotossicità tal-iżvilupp jista' jsir bħala studju separat, inkorporat fi studju dwar it-tossicità riproduttiva u/jew dwar in-newrotossicità fl-adulti (eż., il-metodi ta' ttestjar B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)), jew jizjed ma' studji dwar it-tossicità tal-iżvilupp qabel it-twelid (eż., il-metodu ta' ttestjar B.31 (17)). Meta l-istudju dwar in-newrotossicità tal-iżvilupp ikun inkorporat fi hdan jew ikun marbut ma' studju ieħor, importanti li tinzamm l-integrità taż-żewġ tipi ta' studju. L-ittestjar kollu għandu jikkonforma mal-leġiżlazzjoni applikabbli jew il-linji gwida tal-gvern u istituzzjonali għall-użu ta' annimali tal-laboratorju fir-riċerka (eż., 18).
4. Il-laboratorju tat-testijiet għandu jqis l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test qabel ma jagħmel l-istudju. It-tali informazzjoni ser tinkludi l-identità u l-istruttura tas-sustanza kimika; il-proprietajiet fizikokimiċi tagħha; ir-riżultati ta' kwalunkwe test ieħor *in vitro* jew *in vivo* dwar it-tossicità fuq is-sustanza kimika; dejta tossikoloġika dwar sustanzi kimiċi strutturalment relatati; u l-użu/i antiċipat(i) tas-sustanza kimika. Din l-informazzjoni hija neċessarja biex daww kollha kkonċernati jkun ssodisfati li t-test huwa rilevanti għall-protezzjoni tas-saħħa tal-bniedem, u ser tgħin fl-għażla ta' doża ta' bidu xierqa.

▼ M5

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

5. Is-sustanza kimika tat-test tinghata lill-annimali matul it-tqala u t-treddigh. L-ommijiet jiġu ttestjati biex jiġu vvalutati l-effetti f'nisa tqal u li qed ireddeghu u dan jista' jipprovdi wkoll informazzjoni komparattiva (ommijiet versus ulied). L-ulied jinghażlu b'mod aleatorju minn fost il-boton għal evalwazzjoni tan-newrotossicità. L-evalwazzjoni tikkonsisti f'osservazzjonijiet biex jiġu identifikati anormalitajiet grossi fis-sistema newroloġika jew fl-imġiba, inkluża l-valutazzjoni tal-iżvilupp fiżiku, l-ontogenija tal-imġiba, l-attività motorja, il-funzjoni motorja u sensorjali, u t-tagħlim u l-memorja; u l-evalwazzjoni tal-piżijiet tal-mohħ u n-newropatoloġija matul l-iżvilupp ta' wara t-twelid u l-fażi adulta.
6. Meta l-metodu ta' ttestjar jitwettagħ bħala studju separat, jistgħu jintużaw annimali disponibbli addizzjonali f'kull grupp għal proċeduri speċifiċi relatati man-newromġiba, in-newropatoloġija, in-newrokimika jew l-elettrofizioloġija li jistgħu jżidu mad-dejta miksuba mill-analizijiet rakkomandati minn dan il-metodu ta' ttestjar (16)(19)(20)(21). Il-proċeduri supplimentari jistgħu jkunu partikolarment utli meta osservazzjoni empirika, effetti antiċipati, jew mekkaniżmu/modalità ta' azzjoni jindikaw tip speċifiku ta' newrotossicità. Dawn il-proċeduri supplimentali jistgħu jintużaw fl-ommijiet kif ukoll fil-frieħ. Barra minn hekk, proċeduri *ex vivo* jew *in vitro* jistgħu jintużaw ukoll, diment li dawn il-proċeduri ma jibdlux l-integrità tal-proċeduri *in vivo*.

THEJJJIET GHAT-TEST

L-ghażla tal-ispeċi tal-annimali

7. L-ispeċi ppreferuta għat-test hija l-far; jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn meta jkunu xierqa. Madankollu, il-jiem ta' tqala u ta' wara t-twelid speċifikati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma speċifiċi għal razzeż użati spiss ta' firien, u għandhom jinghażlu jiem komparabbli jekk tintuża speċi differenti jew razza mhux tas-soltu. L-użu ta' speċijiet oħrajn għandu jkun iġġustifikat fuq il-bażi ta' dejta tossikoloġika, farmakokinetika, u/jew oħra. Il-ġustifikazzjoni għandha tinkludi d-disponibilità ta' valutazzjonijiet tan-newromġiba u n-newropatoloġija ta' wara t-twelid speċifiċi għall-ispeċijiet. Jekk kien hemm test preċedenti li qajjem thassib, għandhom jiġu kkunsidrati l-ispeċi/ir-razza li qajmu thassib. Minhabba l-attributi ta' prestazzjoni li jvarjaw ta' razzeż ta' firien differenti, għandu jkun hemm evidenza li r-razza magħżula sabiex tintuża għandha fekondità u risponsività adegwati. L-affidabilità u s-sensittività ta' speċijiet oħrajn biex tiġi identifikata newrotossicità tal-iżvilupp għandhom jiġu dokumentati.

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-ghalf

8. It-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperimenti għandha tkun 22 ± 3 °C. Filwaqt li l-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 % minbarra matul it-tindif tal-kamra, il-mira għandha tkun 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Huwa possibbli wkoll li jinqueleb iċ-ċiklu tad-dawl qabel it-tgħammir u għad-durata tal-istudju, sabiex isiru valutazzjonijiet tal-punti ahħarin funzjonali u tal-imġiba matul il-perjodu mudlam (taħt dawl ahmar), jiġifieri fil-hin li matulu normalment l-annimali jkunu attivi (22). Kwalunkwe bidla fiċ-ċiklu tad-dawl-dlam għandha tinkludi hin adegwat biex dan iċ-ċiklu jindera halli l-annimali jkunu jistgħu jadattaw għaċ-ċiklu l-gdid. Għall-ghalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista bla limitu ta' ilma tajjeb għax-xorb. It-tip ta' ikel u ilma għandu jiġi rrapportat u t-tnejn li huma għandhom jiġu analizzati għal kontaminanti.

▼ M5

9. L-annimali jistgħu jitqiegħdu f'post waħedhom jew f'gagġa fi gruppi żgħar tal-istess sess. Il-proċeduri ta' tghammir għandhom jitwettqu f'gagġe adattati għall-iskop. Wara evidenza ta' kopulazzjoni jew mhux iktar minn 15-il jum ta' tqala, l-annimali mghammrin għandhom jitqiegħdu f'gagġe separati f'gagġe tal-hlas jew tal-maternità. Il-gagġe għandhom jiġu rrangati b'tali mod li jkunu minimizzati l-effetti possibbli minhabba l-pożizzjoni tal-gagġa. L-annimali nisa mghammrin għandhom jingħataw materjal tat-tibjit xieraq u definit meta jkunu waslu biex iwelldu. Huwa magħruf b'mod ġenerali li tqandil mhux kif suppost jew stress matul it-tqala jista' jirriżulta f'riżultati avversi, inkluż korrimment jew żvilupp alterat tal-fetu u wara t-twelid. Bħala protezzjoni kontra telf ta' feti minhabba fatturi li mhumiex relatati mal-kura, l-annimali għandhom jitqandlu bir-reqqa matul it-tqala, u għandu jiġi evitat stress minn fatturi esterni bħal storbju żejjed fuq barra.

Thejjija tal-annimali

10. Għandhom jintużaw annimali b'saħħithom, li draw il-kundizzjonijiet tal-laboratorju u li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali fl-imghoddi, sakemm l-istudju ma jkunx inkorporat fi studju ieħor (ara l-paragrafu 3). L-annimali tat-test għandhom jiġu karatterizzati għall-ispeċi, ir-razza, is-sors, is-sess, il-piż u l-età. Kull annimal għandu jkun assenjat u jiġi mmarkat b'numru uniku ta' identifikazzjoni. Sa fejn dan ikun prattikabbli, l-annimali tal-gruppi kollha tat-test għandhom ikunu tal-istess piż u età u fi hdn il-medda normali tal-ispeċi u r-razza studjata. F'kull livell ta' doża għandhom jintużaw annimali nisa żgħażaġh li qatt ma welldu. Ahwa ma għandhomx jitghammru, u għandha tinxtehet attenzjoni biex dan jiġi żgurat. Il-Jum tat-Tqala (GD) 0 huwa l-jum li fih ikunu osservati l-plakka vaginali u/jew l-isperma. Għandu jingħata hin adegwat ta' akklimatizzazzjoni (eż., 2-3 ijiem) meta jinxtraw annimali tqal minn fornitur. L-annimali tqal għandhom jiġu assenjati b'mod hieles minn preġudizzji fil-gruppi ta' kontroll u kura, u sa fejn dan ikun possibbli, għandhom jitqassmu ndaqs bejn il-gruppi (eż., proċedura aleatorja stratifikata hija rakkomandata biex tkun ipprovduta distribuzzjoni ndaqs fost il-gruppi kollha, bħal dik ibbażata fuq il-piż tal-ġisem). L-annimali nisa inseminati mill-istess raġel għandhom jitqassmu ndaqs bejn il-gruppi.

PROĊEDURA**In-numru u s-sess tal-annimali**

11. Kull grupp tat-test u ta' kontroll għandu jkun fih numru suffiċjenti ta' annimali nisa tqal li jridu jkunu esposti għas-sustanza kimika tat-test biex jiġi żgurat li jiġi prodott numru suffiċjenti ta' ulied għal evalwazzjoni tan-newrotossicità. Huwa rakkomandat totali ta' 20 boton f'kull livell ta' doża. Disinji tad-dożaġġ tal-grupp 'staggered' u tar-replikati huma awtorizzati jekk jintlaħqu n-numri totali ta' boton f'kull grupp, u jekk jintużaw mudelli statistiċi xierqa biex jagħtu kont għar-replikati.
12. Dakinhar tal-jum wara t-twelid (PND) 4 jew qabel (il-jum tal-hlas huwa PND 0), id-daqs ta' kull boton għandu jkun aġġustat billi jiġu eliminati l-frieħ żejda permezz ta' għażla aleatorja biex jinhareġ daqs tal-boton uniformi għall-frieħ kollha (23). Id-daqs tal-boton ma għandux jaqbeż id-daqs medju tal-boton għar-razza ta' rodituri użata (8-12). Il-boton għandu jkollhom, kemm jista' jkun, numri ndaqs ta' frieħ irġiel u nisa. L-eliminazzjoni selettiva tal-frieħ, eż., fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem, mhijiex xierqa. Wara l-istandardizzazzjoni tal-boton (qtil għat-tnaqqis) u qabel iktar testijiet tal-punti aħharin funzjonali, il-frieħ individwali li huma skedati għal testijiet ta' qabel il-ftim jew wara l-ftim għandhom jiġu identifikati b'mod uniku, billi jintuza kwalunkwe metodu umanitarju xieraq għall-identifikazzjoni tal-frieħ (eż., 24).

▼ M5

L-assenjament ta' annimali għal testijiet funzjonali u tal-imġiba, piżijiet tal-mohħ, u evalwazzjonijiet newropatoloġiċi

13. Il-metodu ta' ttestjar jippermetti li jittiehdu diversi approċċi fir-rigward tal-assenjament tal-annimali esposti *in utero* u permezz ta' treddigh għal testijiet funzjonali u tal-imġiba, maturità sesswali, determinazzjoni tal-piż tal-mohħ, u evalwazzjoni newropatoloġika (25). Jistgħu jizjeddu wkoll testijiet oħrajn tal-funzjoni tan-newromġiba (eż., l-imġiba soċjali), in-newrokimika jew in-newropatoloġija fuq bażi ta' każ b'każ, diment li ma tkunx kompromessal-integrità tat-testijiet oriġinali mehtieġa.
14. Il-frieħ jingħazlu minn kull grupp ta' doża u jiġu assenjati għal valutazzjonijiet tal-punti ahħarin fil-PND 4 jew wara. L-ghazla tal-frieħ għandha ssir b'tali mod li ż-żewġ sessi minn kull boton f'kull grupp ta' doża jkunu rappreżentati ndaqs fit-testijiet kollha kemm jista' jkun. Għall-ittestjar tal-attività motorja, l-istess par ta' frieħ irġiel u nisa għandhom jiġu ttestjati fl-etajiet kollha ta' qabel il-ftim (ara l-paragrafu 35). Għat-testijiet kollha l-oħrajn, l-istess pari ta' annimali rġiel u nisa jew oħrajn separati jistgħu jiġu assenjati f'testijiet tal-imġiba differenti. Frieħ differenti jistgħu jkunu jehtieġu li jiġu assenjati għal testijiet ta' frieħ li għadhom kif infatmu versus adult tal-funzjoni konjittiva sabiex jiġi evitat it-tfixkil tal-effetti tal-età u t-taħriġ minn qabel f'dawk il-kejl (26)(27). Fil-ftim (PND 21), il-frieħ li ma jingħazlux għall-ittestjar jistgħu jinqatlu b'mod dinjituż. Kwalunkwe alterazzjoni fl-assenjamenti tal-frieħ għandha tiġi rrapportata. L-unità ta' kejl statistika għandha tkun il-boton (jew l-omm) u mhux il-grupp.
15. Hemm modi differenti ta' kif frieħ jiġu assenjati għal-eżamijiet, testijiet konjittivi, eżamijiet patoloġiċi ta' qabel u wara l-ftim, eċċ., (ara l-Figura 1 għad-disinn ġenerali u l-Appendiċi 1 għal eżempji ta' assenjament). In-numri minimi rakkomandati ta' annimali f'kull grupp ta' doża għal eżamijiet ta' qabel u wara l-ftim huma kif ġejjin:

Osservazzjonijiet kliniċi u piż tal-ġisem	L-annimali
Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati	20/sess (1/sess/boton)
Piż tal-mohħ (wara l-fissazzjoni) PND 11-22	10/sess (1/boton)
Piż tal-mohħ (mhux fissat) ~ PND 70	10/sess (1/boton)
Newropatoloġija (fissazzjoni b'immersjoni jew b'perfusjoni) PND 11-22	10/sess (1/boton)
Newropatoloġija (fissazzjoni b'perfusjoni) PND ~70	10/sess (1/boton)
Maturità sesswali	20/sess (1/sess/boton)
Fażijiet oħrajn fl-iżvilupp (fakultattiva)	L-annimali kollha
Ontogenija tal-imġiba	20/sess (1/sess/boton)
Attività motorja	20/sess (1/sess/boton)
Funzjoni motorja u sensorja	20/sess (1/sess/boton)
Tagħlim u memorja	10/sess ^(a) (1/boton)

^(a) Skont is-sensittività tat-testijiet tal-funzjoni konjittiva, għandha tiġi kkunsidrata investigazzjoni ta' numru kbir u oghla ta' annimali, eż., sa annimal raġel wiehed u annimal mara wahda għal kull boton (għall-assenjamenti tal-annimali ara l-Appendiċi 1) (għidha ulterjuri dwar id-daqs tal-kampjun hija pprovduta fid-Dokument ta' Għidha tal-OECD Nru 43 (8)).

▼ M5

Dożaġġ

16. Għandhom jintużaw tal-inqas tliet livelli ta' doži u kontroll konkurrenti. Il-livelli ta' doża għandhom ikunu distanti biżżejjed biex tinholq gradazzjoni tal-effetti tossiċi. Sakemm ma jkunx limitat mill-ghamla fizikokimika jew il-proprietajiet bijoloġiċi tas-sustanza kimika, l-ogħla livell ta' doża għandu jingħazel bl-għan li jikkaguna xi tossiċità materna (eż., sinjali kliniċi, tnaqqis fiż-żieda fil-piż tal-ġisem (mhux iktar minn 10 %) u/jew evidenza ta' tossiċità li tillimita d-doża f'organu fil-mira). Id-doża għolja tista' tkun limitata għal 1 000 mg/kg/jum tal-piż tal-ġisem, b'xi eċċezzjonijiet. Pereżempju, l-esponiment mistenni tal-bniedem tista' tindika l-bżonn li jintuża livell oghla ta' doża. Inkella għandhom isiru studji pilota jew studji preliminari ta' sejbien tal-medda biex jiġi determinat l-ogħla dożaġġ li għandu jipproduċi grad minimu ta' tossiċità materna. Jekk intwera li s-sustanza kimika tat-test hija tossika għall-iżvilupp fi studju standard tat-tossiċità tal-iżvilupp jew fi studju pilota, l-ogħla livell tad-doża għandu jkun id-doża massima li ma tikkaġunax tossiċità eċċessiva fl-ulied, jew mewt jew malformazzjonijiet *in utero* jew neonatali, biżżejjed biex tkun prekluzja evalwazzjoni sinifikanti ta' newrotossiċità. L-inqas livell ta' doża għandu jkollu l-għan li ma jipproduċi ebda evidenza ta' tossiċità materna jew tal-iżvilupp, inkluża newrotossiċità. Għandha tingħazel sekwenza dikkendenti ta' livelli ta' doża bil-għan li jintwera kwalunkwe rispons relatat mad-doża u Livell ta' Effett Avvers Mhux Osservat (NOAEL), jew doži qrib il-limitu ta' identifikazzjoni li jippermettu li tiġi determinata doża ta' riferiment. Intervalli maqsuma fi tnejn sa erbgħa spiss ikunu ottimali sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' doża dikkendenti, u z-żieda tar-raba' grupp ta' doża spiss ikun ippreferut iktar mill-użu ta' intervalli kbar hafna (eż., iktar minn fattur ta' 10) bejn id-dożaġġi.

17. Il-livelli ta' doża għandhom jingħazlu filwaqt li tittiehed f'kunsiderazzjoni d-dejta eżistenti kollha dwar it-tossiċità kif ukoll l-informazzjoni addizzjonali dwar il-metabolizmu u t-tossikokinetika tas-sustanza kimika tat-test jew materjali relatati. Din l-informazzjoni tista' tgħin ukoll biex turi l-adekwatezza tal-iskeda tad-dożaġġ. Id-dożaġġ dirett tal-frieh għandu jitqies fuq il-bażi tal-esponiment u l-informazzjoni farmakokinetika (28)(29). Għandhom jittiehdu f'kunsiderazzjoni bir-rekka l-benefiċċji u l-iżvantaġġi qabel ma jsiru studji tad-dożaġġ dirett (30).

18. Il-grupp ta' kontroll konkurrenti għandu jkun grupp ta' kontroll b'kura finta jew grupp ta' kontroll b'veikolu jekk jintuża veikolu fl-ghoti tas-sustanza kimika. Normalment l-annimali għandhom jingħataw l-istess volum ta' sustanzi kimiċi jew veikolu tat-test fuq bażi ta' piż tal-ġisem. Jekk jintuża veikolu jew addittiv iehor biex jiġi facilitat id-dożaġġ, għandhom jittiehdu f'kunsiderazzjoni l-karatteristiċi li ġejjin: l-effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu jew iż-żamma tas-sustanza kimika tat-test; effetti fuq il-proprietajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u l-effetti fuq il-konsum ta' ikel jew ilma jew l-istatus nutrizzjonali tal-annimali. Il-veikolu ma għandux jikkaguna effetti li jistgħu jfixxlu l-interpretazzjoni tal-istudju u la għandu jkun tossiku għan-newromġiba u lanqas ma għandu jkollu effetti fuq ir-riproduzzjoni jew l-iżvilupp. Għal veikoli godda, għandu jkun inkluz grupp ta' kontroll b'kura finta minbarra grupp ta' kontroll bil-veikolu. L-annimali fil-grupp(i) ta' kontroll għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod bħall-annimali tal-grupp tat-test.

▼ M5

L-ghoti ta' doži

19. Is-sustanza kimika jew il-veikolu tat-test għandhom jingħataw bl-iktar rotta rilevanti għall-esponiment potenzjali tal-bniedem, u fuq il-bażi ta' informazzjoni disponibbli dwar il-metaboliżmu u d-distribuzzjoni fl-annimali tat-test. Is-soltu, ir-rotta tal-amministrazzjoni tkun orali (eż., gavage, djetetika, permezz ta' ilma tax-xorb), iżda jistgħu jintużaw rotot oħrajn (eż., dermali, tehid man-nifs) skont il-karatteristiċi u r-rotot ta' esponiment antiċipati jew magħrufin għall-bniedem (għwida ulterjuri hija pprovduta fid-Dokument ta' Għwida 43(8)). Għandha tkun ipprovduta għustifikazzjoni għar-rotta tal-amministrazzjoni magħżula. Is-sustanza kimika tat-test għandha tingħata kuljum bejn wieħed u iehor fl-istess hin tal-ġurnata.

20. Normalment, id-doża mogħtija lil kull annimal għandha tkun ibbażata fuq l-iktar determinazzjoni riċenti tal-piż tal-ġisem individwali. Madankollu, meta d-doži jiġu aġġustati matul l-aħħar terz tat-tqala, dan għandu jsir bir-reqqa. Jekk tiġi osservata tossiċità eċċessiva fl-ommijiet ikkurati, daww l-annimali għandhom jinqatlu b'mod dinjituż.

21. Bħala minimu, is-sustanza kimika jew il-veikolu tat-test għandhom jingħataw kuljum lil annimali nisa mghammrin mill-hin tal-impjant (GD 6) sat-treddigh (PND 21), sabiex il-hrief ikunu esposti għas-sustanza kimika tat-test matul l-iżvilupp newroloġiku ta' qabel u wara t-twelid. L-eż. li fiha jibda d-dożaġġ, u d-durata u l-frekwenza tad-dożaġġ, jistgħu jiġu aġġustati jekk l-evidenza tappoġġja disinn sperimentali iktar rilevanti għal esponimenti tal-bniedem. Id-durati tad-dożaġġ għandhom ikunu aġġustati għal speċijiet oħrajn biex jiġi żgurat esponiment matul il-perjodi bikrin kollha tal-iżvilupp tal-moħħ (jiġifieri ekwivalenti għal tkabbir tal-moħħ tal-bniedem ta' qabel it-twelid u kmiem wara t-twelid). Id-dożaġġ jista' jibda mill-bidu tat-tqala (GD 0) għad li għandu jittiehed f'kunsiderazzjoni l-potenzjal li s-sustanza kimika tat-test tikkaguna telf ta' qabel l-impjant. Amministrazzjoni li tibda f'GD 6 tevita dan ir-riskju, iżda l-istadji ta' żvilupp bejn GD 0 u 6 ma jkunux ikkurati. Meta laboratorju jixtri annimali mghammrin biż-żmien, ikun imprattiku li d-dożaġġ jinbeda minn GD 0, u b'hekk GD 6 ikun jum ta' bidu tajjeb. Il-laboratorju tat-test għandu jfassal l-iskeda tad-dożaġġ skont l-informazzjoni rilevanti dwar l-effetti tas-sustanza kimika tat-test, l-esperjenza fl-imghoddi, u kunsiderazzjonijiet loġistiċi; dan jista' jinkludi estensjoni tad-dożaġġ wara l-ftim. Id-dożaġġ ma għandux isehh dakinhar tal-hlas f'daww l-annimali li ma jkunux għadhom welldu l-ulied tagħhom kompletament. B'mod ġenerali, huwa supponut li l-esponiment tal-frieh ser issehħ permezz tal-halib matern; madankollu, dożaġġ dirett tal-frieh għandu jiġi kkunsidrat f'daww il-kazijiet fejn hemm nuqqas ta' evidenza ta' esponiment issuktat għall-ulied. L-evidenza tal-esponiment kontinwu tista' tinkiseb minn eż., informazzjoni farmakokinetika, tossiċità tal-ulied jew bidliet fil-bijoswieq (28).

OSSERVAZZJONIJIET**Osservazzjonijiet tal-ommijiet**

22. L-ommijiet kollha għandhom jiġu osservati bir-reqqa tal-inqas darba kuljum fir-rigward tal-kundizzjoni tas-saħħa tagħhom, inkluża l-morbidità u l-mortalità.

23. Matul il-perjodi tal-kura u l-osservazzjoni, b'mod perjodiku għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi iktar dettaljati (tal-inqas darbtejn matul il-perjodu tad-dożaġġ fit-tqala u darbtejn matul il-perjodu ta' dożaġġ fit-treddigh) billi tal-inqas jintużaw għaxar ommijiet għal kull livell ta' doża. L-annimali għandhom ikunu osservati barra l-gaġġa oriġinali minn tekniċi mħarrġin li ma jafux bil-kura tal-annimali, billi jintużaw proċeduri standardizzati halli jiġi minimizzata l-istress tal-annimali u l-preġudizzju tal-osservaturi, u tiġi massimizzata l-affidabilità bejn l-osservaturi. Meta dan ikun possibbli, huwa rakkomandat li l-osservazzjonijiet fi studju partikolari jsiru mill-istess tekniku.

▼ M5

24. Il-preżenza tas-sinjali osservati għandha tiġi rreġistrata. Kull meta dan ikun possibbli, anki l-kobor tas-sinjali osservati għandu jiġi rreġistrat. L-osservazzjonijiet kliniċi għandhom jinkludu, iżda ma għandhomx ikunu limitati għal, bidliet fil-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet, u l-attività awtonomika (eż., dmugh, piloerezzjoni, daqs tal-ħabba, xejra respiratorja mhux tas-soltu u/jew teħid tan-nifs bil-ħalq, u kwalunkwe sinjal mhux tas-soltu ta' urina jew rawt).
25. Kwalunkwe rispons mhux tas-soltu fir-rigward ta' pożizzjoni tal-ġisem, livell ta' attività (eż., esplorazzjoni mnaqqa jew miżjuda taz-zona standard) u koordinazzjoni tal-moviment għandhom jiġu osservati. Bidliet fil-mixja, (eż., imferċha, atassja), qagħda (eż., hotba) u r-reattività għat-tqandil, it-tqegħid jew stimuli ambjentali oħrajn, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, konvulżjonijiet, roghda, sterjotipi (eż., mixmut wisq, ċaqliq tar-ras mhux tas-soltu, tidwir ripetittiv), imġiba mhux tas-soltu (eż., gdim jew lagħaq eċċessiv, awtomutilazzjoni, mixi lura, tleħhin), jew aggressjoni għandhom jiġu rreġistrati.
26. Sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu rreġistrati, inkluż il-jum tal-bidu, il-hin tal-ġurnata, il-grad, u d-durata.
27. L-annimali għandhom jiġu ppeżati fil-hin tad-dożaġġ tal-inqas darba fil-ġimgħa matul l-istudju, darkinkhar jew qrib il-jum tal-ħlas, u fil-PND 21 (ftim). Għall-istudji ta' gavage, l-ommijiet għandhom jintiżnu tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa. Id-dożi għandhom ikunu aġġustati fil-hin ta' kull determinazzjoni tal-piż tal-ġisem, kif xieraq. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel kull ġimgħa tal-inqas matul it-tqala u t-treddigh. Il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel tal-inqas darba fil-ġimgħa jekk l-esponiment ikun permezz tal-provvista tal-ilma.

L-osservazzjonijiet fuq ulied

28. L-ulied kollha għandhom jiġu osservati bir-reqqa tal-inqas darba kuljum għal sinjali ta' tossiċità u għall-morbilità u l-mortalità.
29. Matul il-perjodi tal-kura u l-osservazzjoni, għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi iktar dettaljati tal-ulied. L-ulied (tal-inqas ferħ/sess/boton wiehed) għandhom ikunu osservati minn tekniċi mharrġin li ma jafux bil-kura tal-annimali, billi jużaw proċeduri standardizzati biex jiġi minimizzat il-preġudizzju u tiġi massimizzata l-affidabilità bejn l-osservaturi. Meta dan ikun possibbli, huwa rakkomandat li l-osservazzjonijiet isiru mill-istess tekniku. Bħala minimu, il-punti aħharin deskritti fil-paragrafi 24 u 25 għandhom jiġu ssorveljati kif xieraq għall-istadju tal-iżvilupp taht osservazzjonijiet.
30. Is-sinjali kollha ta' tossiċità fl-ulied għandhom ikunu rreġistrati, inkluż il-jum tal-bidu, il-hin tal-ġurnata, il-grad u d-durata.

Fażijiet fiżiċi u tal-iżvilupp

31. Bidliet fil-fażijiet ta' żvilupp ta' qabel il-ftim (eż., ftuħ tal-pinna, ftuħ tal-għajnejn, spuntar tal-inċiż) huma ferm korrelati mal-piż tal-ġisem (30)(31). Il-piż tal-ġisem jista' jkun l-aħjar indikatur ta' żvilupp fiżiku. Għaldaqstant, il-kejl tal-fażijiet ta' żvilupp huwa rakkomandat biss meta jkun hemm evidenza minn qabel ta' dawn il-punti aħharin ser jipprovdu informazzjoni addizzjonali. Il-puntwalità għall-valutazzjoni ta' dawn il-parametri hija indikata fit-Tabella 1. Skont l-effetti antiċipati, u r-riżultati tal-kejliet inizjali, jista' jkun rakkomandabbli li jiżdiedu punti tal-hin addizzjonali jew li l-kejl isiru fi stadji oħrajn tal-iżvilupp.

▼ M5

32. Huwa rakkomandat li tintuża l-età ta' wara l-att sesswali minflok l-età ta' wara t-twelid meta jiġi vvalutat l-iżvilupp fiżiku (33). Jekk il-frieh jiġu ttestjati dakinhar tal-ftim, huwa rakkomandat li dan l-ittestjar isir qabel il-ftim propju biex jiġi evitat effett ta' konfużjoni mill-istress marbut mal-ftim. Barra minn hekk, kwalunkwe ttestjar ta' wara l-ftim tal-frieh ma għandux isehh matul il-jumejn ta' wara l-ftim.

Tabella 1

Il-puntwalità tal-valutazzjoni tal-fażijiet fiżiċi u tal-iżvilupp, u punti ahharin funzjonali/tal-imġiba ^(a)

Perjodi tal-Età	Qabel il-ftim ^(b)	Adolexxenza ^(b)	Żgħażaġħ ^(b)
Punti Ahharin			

Fażijiet fiżiċi u tal-iżvilupp

Piż tal-Ġisem u Osservazzjonijiet Kliniċi	fil-ġimġha ^(c)	tal-inqas kull ġimġhatejn	tal-inqas kull ġimġhatejn
Piż tal-mohħ	PND 22 ^(d)		fit-terminazzjoni
Newropatoloġija	PND 22 ^(d)		fit-terminazzjoni
Maturità sesswali	—	kif xieraq	—
Fażijiet oħrajn tal-iżvilupp ^(e)	kif xieraq	—	—

Punti ahharin funzjonali/tal-imġiba

Ontogenija tal-imġiba	Tal-inqas żewġ kejljet		
Attività motorja (inkluża d-drawwa)	1–3 darbjet ^(f)	—	darba
Funzjoni motorja u sensorjali	—	darba	darba
Tagħlim u memorja	—	darba	darba

^(a) Din it-tabella tippreżenta n-numru minimu ta' drabi meta għandhom isiru l-kejljet. Skont l-effetti antiċipati, u r-risultati tal-kejljet inizjali, jista' jkun rakkomandabbli li jiżdiedu punti ta' żmien addizzjonali (eż., annimali mdahhlin fl-età) jew li jitwettqu l-kejljet fi stadji oħrajn tal-iżvilupp.

^(b) Huwa rakkomandat li l-frieh ma jiġux ittestjati matul il-jumejn wara l-ftim (ara l-paragrafu 31). L-etajiet rakkomandati għall-ittestjar adoloxxenti huma: tagħlim u memorja = PND 25 ± 2; funzjoni motorja u sensorjali = PND 25 ± 2. Etajiet rakkomandati għall-ittestjar ta' żgħażaġħ huma PND 60-70.

^(c) Il-piżijiet tal-ġisem għandhom jitkejlu tal-inqas darbtejn fil-ġimġha meta l-frieh jiġu dożati direttament għall-aġġustament tad-dożi fi żmien ta' zieda rapida fil-piż tal-ġisem.

^(d) Il-piżijiet tal-ġisem u n-newropatoloġija jistgħu jiġu vvalutati f'xi żmien li jiġi qabel (eż., PND 11), jekk xieraq (ara l-paragrafu 39).

^(e) Fażijiet oħrajn tal-iżvilupp minbarra l-piż tal-ġisem (eż., ftuħ tal-ghajnejn) għandhom jiġu rreġistrati meta xieraq (ara l-paragrafu 31).

^(f) Ara l-paragrafu 35.

33. Il-brief hajjin għandhom jingħaddu u jitqassmu skont is-sess eż., permezz ta' spezzjoni viżwali jew kejl tad-distanza anogenitali (34)(35), u kull ferh fi hdan boton għandu jintiżen b'mod individwali fit-twelid jew ftit wara, tal-inqas darba fil-ġimġha matul it-treddigh, u tal-inqas darba kull ġimġhatejn wara. Meta tiġi evalwata l-maturità sesswali, l-età u l-piż tal-ġisem tal-annimal meta ssehh patenza vaġinali (36) jew separazzjoni preputjali (37) għandhom jiġu ddeterminati għal tal-inqas annimal raġel wiehed u annimal mara wiehed għal kull boton.

▼ M5

Ontogenija tal-imġiba

34. L-ontogenija tal-imġibiet magħżulin għandha titkejjel f'tal-inqas ferh/sess/-boton wiehed matul il-perjodu tal-età xieraq, bl-istess frieh li jintużaw fil-jiem kollha tat-test għall-imġibiet kollha vvalutati. Il-jiem tal-kejl għandhom jitqassmu b'mod regolari tul dak il-perjodu biex tiġi definita l-bidla normali jew dik relatata mal-kura fl-ontogenija ta' dik l-imġiba (38). Dawn li ġejjin huma xi eżempji ta' mġibiet li tista' tiġi vvalutata l-ontogenija tagħhom: rifless sabiex l-annimal iqum fuq saqajh, ġeotassi negattiva u attività motorja (38)(39)(40).

L-attività motorja

35. L-attività motorja għandha tiġi ssorveljata (41)(42)(43)(44)(45) matul il-perjodi ta' età ta' qabel il-ftim u tal-adulterza. Għall-ittestjar fil-hin tal-ftim, ara l-paragrafu 32. Is-sessjoni tat-test għandha tkun twila biżżejjed biex tintwera drawwa bejn is-sessjonijiet għal kontrolli mhux ikkurati. L-użu tal-attività motorja biex tiġi vvalutata l-ontogenija tal-imġiba huwa ferm rakkomandat. Jekk jintuża bħala test tal-ontogenija tal-imġiba, f'dak il-każ l-ittestjar għandu juża l-istess annimali għas-sessjonijiet kollha tat-test ta' qabel il-ftim. L-ittestjar għandu jkun spiss biżżejjed biex tiġi vvalutata l-ontogenija tad-drawwa fi hdan is-sessjoni (44). Dan jista' jkun jehtieg tliet perjodi ta' żmien jew iktar qabel, u inkluz, il-jum tal-ftim (eż., PND 13, 17, 21). L-ittestjar tal-istess annimali, jew shab tal-boton, għandu jsehh f'età adulta qrib tmiem l-istudju (eż., PND 60-70). L-ittestjar f'jiem addizzjonali jista' jsir kif ikun hemm b'żonn. L-attività motorja għandha tiġi ssorveljata permezz ta' apparat awtomatizzat li jriregistra l-attività li għandu jkun kapaċi jidentifika kemm zidiet kif ukoll tnaqqisijiet fl-attività (jiġifieri attività bażi kif imkejla mill-istrument ma għandhiex tkun baxxa wisq tant li tipprekludi l-identifikazzjoni ta' tnaqqisijiet, u lanqas għolja wisq tant li tipprekludi l-qbid ta' zidiet fl-attività). Kull strument għandu jiġi ttestjat permezz ta' proċeduri standard biex tkun żgurata, kemm jista' jkun, l-affidabilità tal-operazzjoni bejn apparati u fost il-jiem. Kemm jista' jkun, il-gruppi tal-kura għandhom jiġu b'bilanċjati bejn l-istrumenti. Kull annimal għandu jiġi ttestjat b'mod individwali. Il-gruppi tal-kura għandhom ikunu kontrobalanċjati bejn hinijiet tat-test biex tiġi evitata konfużjoni permezz tar-ritmi ċirkadjani tal-attività. Għandhom isiru sforzi biex jiġi żgurat li l-varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test huma minimi u mhumieks sistematiċament relatati mal-kura. Fost il-varjabbli li jistgħu jaffettwaw afna miżuri tal-imġiba, inkluzja l-attività motorja, hemm il-livell tal-hoss, id-daqs u l-forma tal-gaġġa tat-test, it-temperatura, l-umdità relattiva, il-kundizzjonijiet tad-dawl, l-irwejjaħ, l-użu tal-gaġġa oriġinali jew gaġġa tat-test ġdida u distrazzjonijiet ambjentali.

Il-funzjoni motorja u sensorjali

36. Il-funzjoni motorja u sensorjali għandha tiġi analizzata f'dettall tal-inqas darba għall-perjodu adoloxxenti u darba matul il-perjodu taż-żgħożija (eż., PND 60-70). Għall-ittestjar fi żmien il-ftim, ara l-paragrafu 32. Għandu jsir ittestjar suffiċjenti biex jiġi żgurat kampjunar kwantitattiv adegwat tal-modalitajiet sensorjali (eż., somatosensorjali, vestibulari) u l-funzjonijiet motorji (eż., saħha, koordinazzjoni). F'tit eżempji ta' testijiet għall-funzjoni motorja u sensorjali huma rispons għal forza (46), rifless biex l-annimal iqum fuq saqajh (47)(48), drawwa ta' qatgħa awditorja (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54), u potenzjali evokati (55).

▼ **M5****Testijiet tat-tagħlim u tal-memorja**

37. Għandu jsir test tat-tagħlim u l-memorja assoċjattivi wara l-ftim (eż., 25 ± 2 jum) u għal żgħażaġh (PND 60 u iktar). Għall-ittestjar fi żmien il-ftim, ara l-paragrafu 32. L-istess test(ijiet) jew oħrajn separati jistgħu jintużaw f'dawn iż-żewġ stadji tal-iżvilupp. Jista' jkun hemm xi flessibilità fl-għażla tat-test(ijiet) għat-tagħlim u l-memorja f'firien li jkunu għadhom kif infatmu u adulti. Madankollu, it-test(ijiet) għandhom jifasslu b'tali mod li jissodisfaw żewġ kriterji. L-ewwel nett, it-tagħlim għandu jiġi vvalutat jew bħala bidla fuq bosta provi jew sessjonijiet ripetuti ta' tagħlim, jew, f'testijiet li jinvolvu prova waħda, b'referenza għal kundizzjoni li tivverifika hemmx effetti mhux assoċjattivi tal-esperjenza ta' tahrig. It-tieni, it-test(ijiet) għandu jinkludi xi kejl tal-memorja (tat-terminu qasir jew fit-tul) minbarra t-tagħlim oriġinali (kisba), iżda dan il-kejl tal-memorja ma jistax ikun irrapportat fin-nuqqas ta' miżura ta' kisba miksuta mill-istess test. Jekk it-test(ijiet) tat-tagħlim u l-memorja juri/u effett tas-sustanza kimika tat-test, jistgħu jiġu kkunsidrati testijiet addizzjonali biex jiġu evitati interpretazzjonijiet alternattivi bbażati fuq alterazzjonijiet fil-kapaċitajiet sensorjali, motivazzjonali u/jew motorji. Minbarra dawn iż-żewġ kriterji ta' hawn fuq, huwa rakkomandat li t-test tat-tagħlim u l-memorja jingħażel fuq il-bażi tas-sensittività murija tiegħu għall-klassi tas-sustanza kimika investigata, jekk it-tali informazzjoni tkun disponibbli fit-tagħrif. Fin-nuqqas ta' din l-informazzjoni, eżempji ta' testijiet li jistgħu jsiru biex jiġu ssodisfati -kriterji ta' hawn fuq jinkludu: evitar passiv (43)(56)(57), tlaqqigh ittardjat mal-pożizzjoni għall-far adult (58) u għall-far tarbija (59), il-kundizzjonament olfattiv (43)(60), il-labirint fl-ilma ta' Morris (61)(62)(63), il-labirint ta' Biel jew Cincinnati (64)(65), il-labirint b'fethiet radjali (66), il-labirint T (43), u l-kisba u ż-żamma ta' mġiba kkontrollata minn skeda (26)(67)(68). Hemm testijiet addizzjonali deskritti fit-tagħrif dwar firien li jkunu għadhom kif infatmu (26)(27) u firien adulti (19)(20).

Awtopsja

38. L-annimali materni jistgħu jiġu ewtanizzati wara l-ftim tal-ulied.
39. L-evalwazzjoni newropatoloġika tal-ulied ser issir billi jintużaw tessuti minn annimali maqtulin b'mod dinjituż fil-PND 22 jew f'punt ta' żmien qabel bejn PND 11 u PND 22, kif ukoll fi tmiem l-istudju. Għal ulied maqtulin sal-PND 22, għandhom jiġu evalwati t-tessuti tal-mohh; għal annimali maqtulin fit-tmiem, għandhom jiġu evalwati kemm it-tessuti tas-sistema nervuża ċentrali (CNS) kif ukoll it-tessuti tas-sistema nervuża periferali (PNS). L-annimali maqtulin fil-PND 22 jew qabel jistgħu jiġu fissati jew permezz ta' immersjoni jew perfużjoni. L-annimali maqtulin fi tmiem l-istudju għandhom jiġu fissati permezz ta' perfużjoni. L-aspetti kollha tat-thejjija tal-kampjuni ta' tessut, mill-perfużjoni tal-annimali sad-dissezzjoni tal-kampjuni tat-tessuti, l-ipproċessar tat-tessuti, u t-tilwin tas-slides għadhom iħaddmu disinn kontrobalanċjat b'tali mod li kull lott ikun fih kampjuni rappreżentattivi minn kull grupp ta' doża. Tista' tinstab gwida addizzjonali dwar in-newropatoloġija fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru. 20(9), ara wkoll (103).

L-ipproċessar ta' kampjuni tat-tessuti

40. Għandha tittiehed nota tal-anormalitajiet grossi kollha li jidhru fi żmien in-nekropsja. Il-kampjuni tat-tessut meħudin għandhom jirrappreżentaw ir-regġuni l-kbar kollha tas-sistema nervuża. Il-kampjuni tat-tessut għandhom jinżammu b'mod fissattiv xieraq u jiġu pproċessati skont protokoll standardizzati ppubblikati dwar l-istoloġija (69)(70)(71)(103). L-impjantazzjoni tal-paraffina hija aċċettabbli għal tessuti tas-CNS u l-PNS, iżda l-użu ta' ożmju wara l-fissazzjoni, flimkien ma' impjantazzjoni tal-eppossid, jista' jkun

▼ M5

xieraq meta jkun hemm bżonn ta' grad oghla ta' riżoluzzjoni (eż., għal nervi periferali meta tkun suspettata newropatija periferali u/jew anaizi morfometrika tan-nervi periferali). It-tessut tal-mohħ miġbur għal anaizi morfometrika għandu jiġi impjantat fil-midjums xierqa fil-livelli tad-doża kollha fl-istess hin sabiex jiġu evitati oġġetti li jickien u li jistgħu jkunu assoċjati ma' hażna mtawla f'fissattiv (6).

Eżami newropatoloġiku

41. L-iskopijiet tal-eżami kwalitattiv huma:

- (i) li jidentifika reġjuni fis-sistema nervuża li jesibixxu evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi;
- (ii) li jidentifika tipi ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi li jirriżultaw minn esponiment għas-sustanza kimika tat-test; u
- (iii) li jiddetermina l-medda tas-severità tal-alterazzjonijiet newropatoloġiċi.

It-taqsimiet istoloġiċi rappreżentattivi mill-kampjuni tat-tessut għandhom jiġu eżaminati bil-mikroskopju minn patoloġista mħarreg kif xieraq għal evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi. L-alterazzjonijiet newropatoloġiċi kollha għandhom jiġu assenjati grad suġġettiv li jindika s-severità. Tilwin b'ematoxilina u eosina jista' jkun biżżejjed biex jiġu evalwati taqsimiet tal-mohħ minn annimali maqtulin b'mod dinjituż fil-PND 22, jew qabel. Madankollu, tilwin tal-mjelin (eż., luxol fast blue/cresyl violet) u tilwin lewn il-fidda (eż., tilwin ta' Bielschowsky jew Bodians) huma rakkomandati għat-taqsimiet tat-tessuti tas-CNS u l-PNS minn annimali maqtulin fi tmiem l-istudju. Soġġetti għall-ġudizzju professjonali tal-patoloġista u t-tip ta' alterazzjonijiet osservati, tilwin iehor jista' jitqies xieraq biex jiġu identifikati u kkaratterizzati tipi partikolari ta' alterazzjonijiet (eż., proteina aċidika fibrillari glijali (GFAP) jew istokimika tal-lektina biex jiġu vvalutati alterazzjonijiet glijali u mikroglija (72), fluoro-jade biex tiġi identifikata nekrozi (73)(74), jew tilwin tal-fidda speċifiku għad-deġenerazzjoni newrali (75)).

42. Għandha ssir evalwazzjoni morfometrika (kwantitattiva) peress li din id-dejta tista' tgħin fl-identifikazzjoni ta' effett relatat mal-kura u hija utli fl-interpretazzjoni tad-differenzi relatati mal-kura fil-piż tal-mohħ jew il-morfoloġija (76)(77). It-tessut nervuż għandu jiġi kampjunat u jithejja biex tkun tista' ssir evalwazzjoni morfometrika. L-evalwazzjonijiet morfometriċi jistgħu jinkludu eż., kejljet lineari jew areali ta' reġjuni speċifiċi tal-mohħ (78). Kejljet lineari jew areali jehtiegu l-użu ta' taqsimiet omologi magħżulin bir-rekka fuq il-bażi ta' punti referenzjarji mikroskopiċi affidabbli (6). Tista' tintuża l-istereoloġija biex jiġu identifikati effetti relatati mal-kura fuq parametri bħall-volum jew in-numru ta' ċelloli għal reġjuni newroanatomiki speċifiċi (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. L-imħuħ għandhom jiġu eżaminati għal kwalunkwe evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi relatati mal-kura u għandhom jittiehdu kampjuni adegwati mir-reġjuni ewlenin kollha tal-mohħ (eż., il-basal olfattivi, il-kortiċi cerebrali, l-ippokampu, il-gangliji tal-bażi, it-talamu, l-ipotalamu, il-meżenċefalu (tektum, tegmentum, u pendunkuli cerebrali), il-pont, il-medulla tawwalija, iċ-ċervellet) biex jiġi żgurat eżami dettaljat. Importanti li t-taqsimiet għall-annimali kollha jittiehdu fl-istess pian. F'adulti maqtulin b'mod dinjituż fi tmiem l-istudju, għandhom jittiehdu kampjuni mit-taqsimiet rappreżentattivi tas-sinsla tad-dahar u l-PNS. Iż-zoni eżaminati għandhom jinkludu l-ghajn bin-nerv ottiku u r-retina, is-sinsla tad-dahar fin-nefiet ċervikali u lombari, il-fibri tal-għeruq dorsali u ventrali, in-nerv xjatiċi prossimali, in-nerv tat-tibja prossimali (fl-irkoppa), u l-għeruq tal-muskolu tal-pexxul tan-nerv tat-tibja. It-taqsimiet tas-sinsla tad-dahar u tan-nerv periferali għandhom jinkludu kemm it-taqsimiet djaġonali jew trasversali kif ukoll longitudinali.

▼ M5

44. L-evalwazzjoni newropatoloġika għandha tinkludi eżami għal indikazzjonijiet ta' hsara tal-iżvilupp fis-sistema nervaża (6)(85)(86)(87)(88)(89), minbarra l-alterazzjonijiet ċellolari (eż., vakwolazzjoni newronali, deġenerazzjoni, nekrozi) u bidliet fit-tessut (eż., glijozi, infiltrazzjoni lewkoċitika, formazzjoni ċistika). F'dan ir-rigward, importanti li l-effetti relatati mal-kura jiġu distinti minn avvenimenti normali tal-iżvilupp li jkunu magħrufin li jsejtnu fi stadju tal-iżvilupp li jikkorrispondu għall-hin tas-sagrifiċċju (90). L-eżempji ta' alterazzjonijiet sinifikanti li jindikaw hsara tal-iżvilupp jinkludu, iżda mhumiex limitati għal:

- alterazzjonijiet fid-daqs jew il-forma gross tal-basal olfattivi, iċ-ċerebru jew iċ-ċervellett,
- alterazzjonijiet fid-daqs relattiv tal-bosta reġjuni tal-mohħ, inklużi tnaqqisijiet jew żidiet fid-daqs tar-reġjuni li jirriżultaw mit-telf jew il-persistenza ta' popolazzjonijiet normalment temporanji ta' ċelloli jew projezzjonijiet assonali (eż., saff ġerminali estern jew ċervellett, corpus callosum),
- alterazzjonijiet fil-proliferazzjoni, il-migrazzjoni, u d-differenzazzjoni, kif indikat miż-żoni ta' apoptozi jew nekrozi eċċessiva, għoqiedi jew popolazzjonijiet mifruxin ta' newroni ektopiċi, diżorjentati jew malformati jew alterazzjonijiet fid-daqs rileattivi tal-bosta saffi ta' strutturi kortikali,
- alterazzjonijiet fil-mudelli ta' mjelinazzjoni, inkluż tnaqqis ġenerali fid-daqs jew tilwin alterat ta' strutturi mjelinati,
- evidenza ta' idroċefalu, b'mod partikolari tkabbir tal-ventrikli, stenozi tal-akwedott ċerebrali u tidjiq tal-emisferi ċerebrali.

Analizi tar-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons tal-alterazzjonijiet newropatoloġiċi

45. Hija rakkomandata l-proċedura bbażata fuq passi li ġejja għall-analizijiet newropatoloġiċi kwalitattivi u kwantitattivi. L-ewwel nett, it-taqsimiet mill-grupp ta' doża għolja huma mqabblin ma' dawg tal-grupp ta' kontroll. Jekk ma tinstab ebda evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi fl-annimali tal-grupp ta' doża għolja, ma jkun hemm bżonn ta' ebda analizi ulterjuri. Jekk tinsab evidenza ta' alterazzjonijiet newropatoloġiċi fil-grupp ta' doża għolja, jiġu eżaminati l-annimali mill-gruppi ta' doża intermedja u baxxa. Jekk il-grupp ta' doża għolja jintemm minhabba mewt jew tossiċità oħra ta' konfużjoni, il-gruppi ta' doża għolja u intermedja għandhom jiġu analizzati għal alterazzjonijiet newropatoloġiċi. Jekk ikun hemm xi indikazzjoni ta' newrotossicità fil-gruppi ta' doża baxxa, għandha ssir analizi newropatoloġika f'dawg il-gruppi. Jekk tinstab xi alterazzjoni newropatoloġika relatata mal-kura fl-eżami kwalitattivi jew kwantitattivi, għandha tiġi ddeterminata d-dipendenza fuq id-doża tal-inċidenza, il-frekwenza u l-grad ta' severità tal-leżjonijiet jew tal-alterazzjonijiet morfometriċi, fuq il-bażi ta' evalwazzjoni tal-annimali kollha mill-gruppi ta' doża kollha. F'din l-evalwazzjoni għandhom ikunu inklużi r-reġjuni tal-mohħ li jesibixxu xi evidenza ta' alterazzjoni newropatoloġika għandhom ikunu inklużi. Ir-reġjuni kollha tal-mohħ li jesibixxu xi evidenza ta' alterazzjoni newropatoloġika għandhom għal kull tip ta' leżjoni, għandhom jiġu deskritti l-karatteristiċi użati biex jiġi definit kull grad ta' severità, billi jiġu indikati l-karatteristiċi użati għad-differenzazzjoni ta' kull grad. Il-frekwenza ta' kull tip ta' leżjoni u l-grad ta' severità tagħha għandhom jiġu rreġistrati u għandha ssir analizi statistika biex tiġi evalwata l-għamla ta' relazzjoni bejn id-doża u r-rispons. Huwa rakkomandat li jintużaw slides kodifikati (91).

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

46. Id-dejta għandha tiġi rrapportata b'mod individwali u tingabar fil-qosor f'forma tabulari, li għal kull grupp tat-test turi t-tipi ta' bidla u n-numru ta' ommijiet, l-ulied skont is-sess, u l-boton li juru kull tip ta' bidla. Jekk ikun sar esponiment dirett tal-frieh wara t-twelid, għandhom jiġu rrapportati r-rotta, id-durata u l-perjodu ta' esponiment.

▼ M5

Evalwazzjoni u interpretazzjoni tar-riżultati

47. Studju dwar in-newrotossicità tal-iżvilupp ser jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' esponiment ripetut għal sustanza kimika matul żvilupp *in utero* u kmieni wara t-twelid. Peress li jinxtehet enfasi kemm fuq punti aħharin tat-tossicità generali kif ukoll tan-newrotossicità tal-iżvilupp, ir-riżultati tal-istudju ser jippermettu li ssir distinzjoni bejn effetti tan-newrożvilupp li jsejnhu fin-nuqqas ta' tossicità materna, u dawk li jkunu espressi biss fl-ivell li huma tossiċi wkoll għall-annimal matern. Minhabba l-interrelazzjonijiet kumplessi bejn id-disinn tal-istudji, l-analizi statistika, u l-importanza bijoloġika tad-dejta, interpretazzjoni adegwata tad-dejta dwar in-newrotossicità tal-iżvilupp ser tinvolvi ġudizzju tal-esperti (107)(109). L-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test għandha tuża approċċ ta' piż tal-evidenza (20)(92)(93)(94). Għandhom jiġu diskussi l-mudelli tas-sejbiet tal-imġiba jew morfoloġiċi, jekk ikunu preżenti, kif ukoll evidenza tar-rispons għad-doza. Dejta mill-istudji kollha rilevanti għall-evalwazzjoni tan-newrotossicità tal-iżvilupp, inkluzi studji jew rapporti ta' kazijiet epidemjoloġiċi tal-bniedem, u studji sperimentali fuq annimali (eż., dejta tossikokinetika, informazzjoni struttura-attività, dejta minn studji oħrajn dwar it-tossicità) għandha tkun inklusa f'din il-karatterizzazzjoni. Dan jinkludi r-relazzjoni bejn id-dozi tas-sustanza kimika tat-test u l-preżenza jew in-nuqqas, l-inċidenza, u d-daqs ta' kwalunkwe effett newrotossiku għal kull sess (20)(95).
48. L-evalwazzjoni tad-dejta għandha tinkludi taħdita kemm fuq l-importanza bijoloġika kif ukoll dik statistika. L-analizi statistika għandha titqies bħala għodda li tiggwida minflok tiddetermina l-interpretazzjoni tad-dejta. In-nuqqas ta' importanza statistika ma għandux ikun l-unika bażi għall-konkluzjoni ta' nuqqas ta' effett relatat mal-kura, u lanqas mal-importanza statistika ma għandha tkun l-unika ġustifikazzjoni għall-konkluzjoni ta' effett relatat mal-kura. Bħala protezzjoni kontra sejbiet negattivi foloz u d-diffikultajiet inerenti fil-“prova ta' negattiv”, għandha tiġi diskussa dejta kontroll storiku u pożittiv disponibbli, speċjalment meta ma jkun hemm l-ebda effett relatat mal-kura (102)(106). Il-probabilità ta' pożittivi foloz għandha tiġi diskussa fid-dawl tal-evalwazzjoni statistika shiha tad-dejta (96). L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni, jekk ikun hemm waħda, bejn alterazzjonijiet newropatoloġiċi u tal-imġiba osservati.
49. Ir-riżultati kollha għandhom jiġu analizzati billi jintużaw mudelli statistiċi xierqa għad-disinn sperimentali (108). L-għażla ta' analizi parametrika jew nonparametrika għandha tkun iġġustifikata billi jiġu kkunsidrati fatturi bħall-għamla tad-dejta (trasformata jew le) u d-distribuzzjoni tagħha, kif ukoll ir-robustezza relattiva tal-analizi statistika magħżula. L-iskop u d-disinn tal-istudju għandhom jiggwida l-għażla tal-analizzjiet statistiċi biex jiġu minimizzati żbalji tat-Tip I (pożittiv falz) u tat-Tip II (negattiv falz)(96)(97)(104)(105). L-istudji tal-iżvilupp li jużaw speċi li jwelledu hafna frieh u li fihom jiġu ttestjati diversi ħrief għal kull boton għandhom jinkludu l-boton fil-mudell statistiku bħala protezzjoni kontra rati ta' żball tat-Tip I imkabrin (98)(99)(100)(101). L-unità statistika tal-kejl għandha tkun il-boton u mhux il-ferħ. L-esperimenti għandhom jitfasslu b'tali mod li l-aħwa tal-boton ma jitqisux osservazzjonijiet indipendenti. Kwalunkwe punt aħhari mkejjejl b'mod ripetut fl-istess suġġett għandu jiġi analizzat billi jintużaw mudelli statistiċi li jiehdu f'kunsiderazzjoni n-nuqqas ta' dipendenza ta' dawk il-kejliet.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test:

— in-natura fiżika u, fejn rilevanti, il-proprietajiet fiżjokimiċi,

— dejta ta' identifikazzjoni, inkluz is-sors,

▼ **M5**

- il-purità tal-preparazzjoni, u impuritajiet magħrufin u/jew antiċipati.

Veikolu (jekk xieraq):

- ġustifikazzjoni tal-ġhażla tal-veikolu, jekk mhuwiex ilma jew soluzzjoni salmastra fiżjoloġika.

Annimali tat-test:

- l-ispeċi u r-razza użati, u ġustifikazzjoni jekk ma jintużax far,
- il-fornitur tal-annimali tat-test,
- in-numru, l-età fil-bidu, u s-sess tal-annimali,
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija, id-dieta, l-ilma, eċċ.,
- il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

- il-hsieb wara l-ġhażla tal-livell ta' doża,
- il-hsieb wara r-rotta tad-dożaġġ u l-perjodu ta' żmien,
- l-ispeċifikazzjonijiet tad-dozi mogħtijin, inklużi d-dettalji tal-veikolu, il-volum u l-forma fiżika tal-materjal mogħti,
- dettalji dwar il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/il-preparazzjoni tad-dieta, il-koncentrazzjoni, l-istabilità u l-omoġenità miksubin tal-preparazzjoni,
- il-metodu użat għall-identifikazzjoni unika tal-ommijiet u l-ulied,
- deskrizzjoni dettaljata tal-proċedura/i aleatorja/i użata/i biex l-ommijiet jiġu assenjati għal gruppi tal-kura, biex jingħaḥu l-frieh għall-ġhażla, u biex il-frieh jiġu assenjati għal gruppi tat-test,
- dettalji tal-ghoti tas-sustanza kimika tat-test,
- konverżjoni minn koncentrazzjoni tad-dieta/ilma tax-xorb jew tas-sustanza kimika tat-test li tittiehed man-nifs (ppm) għad-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli,
- il-kundizzjonijiet ambjentali,
- dettalji tal-kwalità tal-ikel u l-ilma (eż., tat-tapp, distillat);
- id-dati ta' meta beda u spiċċa l-istudju.

Osservazzjonijiet u proċeduri tat-test:

- deskrizzjoni dettaljata tal-proċeduri użati biex l-osservazzjonijiet u l-proċeduri jiġu standardizzati kif ukoll definizzjonijiet operazzjonali għall-punteġġ tal-osservazzjonijiet;
- lista tal-proċeduri kollha tat-test użati, u ġustifikazzjoni għall-użu tagħhom;
- dettalji tal-proċeduri tal-imġiba/funzjonali, patoloġiċi, newrokimiċi jew elettrofizjoloġiċi użati, inklużi informazzjoni u dettalji dwar strumenti awtomatizzati;
- proċeduri għall-kalibrage u l-iżgurar tal-ekwivalenza tal-istrumenti u l-ibbilanċjar tal-gruppi tal-kura fil-proċeduri tal-ittestjar;
- ġustifikazzjoni qasira li tispjega kwalunkwe deċiżjoni li tinvolvi ġudizzju professjonali.

▼ **M5**

Riżultati (individwali u sommarju, inklużi l-medja u l-varjanza meta jkunu xierqa):

- in-numru ta' annimali fil-bidu tal-istudju u n-numru fi tmiem l-istudju,
- in-numru ta' annimali u boton użati għal kull metodu tat-test,
- in-numru ta' identifikazzjoni ta' kull annimal u l-boton li gie minnu,
- id-daqs tal-boton u l-piż medju fil-bidu skont is-sess,
- dejta dwar il-piż tal-gisem u dwar il-bidla fil-piż tal-gisem, inkluż il-piż tal-gisem terminali għall-ommijiet u l-ulied,
- dejta dwar il-konsum ta' ikel, u dejta dwar il-konsum ta' ilma jekk xierqa (eż., jekk is-sustanza kimika tat-test tinghata permezz tal-ilma),
- dejta dwar ir-rispons tossiku skont is-sess u l-livell ta' doża, inklużi sinjali tat-tossicità jew il-mortalità, inklużi l-hin u l-kawża tal-mewt, jekk xieraq,
- in-natura, is-severità, id-durata, il-jum tal-bidu, il-hin tal-gurnata, u l-kors sussegwenti tal-osservazzjonijiet kliniċi dettaljati,
- il-puntegg f'kull fażi tal-iżvilupp (il-piż, il-maturità sesswali u l-ontogenija tal-imġiba) f'kull hin ta' osservazzjoni,
- deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha tal-imġiba, funzjonali, newropatoloġiċi, newrokimiċi, elettrofizjoloġiċi skont is-sess, inklużi kemm židiet kif ukoll tnaqqisiet minn kontrolli,
- sejbiet dwar in-nekropsija,
- piżijiet tal-gisem,
- kwalunkwe dijanjosi msawra minn sinjali newroloġiċi u leżjonijiet, inklużi mard jew kundizzjonijiet li jseħhu b'mod naturali,
- stampi ta' sejbiet eżemplari,
- stampi b'enerġija baxxa biex tiġi vvalutata l-omoloġija tas-sezzjonijiet użati għall-morfometrija,
- dejta dwar l-assorbiment u l-metabolizmu, inkluża dejta komplimentari minn studju tossikokinetiku separat, jekk disponibbli,
- it-trattament statistiku tar-riżultati, inklużi mudelli statistiċi użati biex tiġi analizzata d-dejta, u r-riżultati, irrilevanti jekk kinux sinifikanti jew le,
- lista tal-persunal tal-istudju, inkluż it-tahriġ professjonali.

Diskussjoni tar-riżultati:

- informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, skont is-sess u l-grupp,
- relazzjoni ta' kwalunkwe effett tossiku iehor ma' konklużjoni dwar il-potenzjal newrotossiku tas-sustanza kimika tat-test, skont is-sess u l-grupp,
- l-impatt ta' kwalunkwe informazzjoni tossikokinetika fuq il-konklużjonijiet,
- is-similaritajiet tal-effetti ta' kwalunkwe newrotossiku maghruf,

▼ **M5**

- dejta li ssostni l-affidabilità u s-sensittività tal-metodu tat-test (jigifieri dejta ta' kontroll storiku u pożittiv),
- ir-relazzjonijiet, jekk jezistu, bejn l-effetti newropatoloġiċi u funzjonali,
- l-NOAEL jew id-doża ta' riferiment għal ommijiet u ulied, skont is-sess u l-grupp.

Konklużjonijiet:

- diskussjoni dwar l-interpretazzjoni ġenerali tad-dejta bbażata fuq ir-risultati, inkluża konklużjoni dwar jekk is-sustanza kimika tat-test ikka-ġunatx newrotossiċità tal-iżvilupp u l-NOAEL.

TAGHRIF

- (1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, id-Danimarka, 13-14 ta' Ġunju 1995.
- (2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Disponibbli fuq: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- (3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Disponibbli fuq: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- (4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Miles, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79-91.
- (5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Miles, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101-111.
- (6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93-100.
- (7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., Stati Uniti, 23-25 ta' Ottubru 2000.
- (8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Pariġi. Lulju 2008. Disponibbli fuq: [[http://search.oecd.org/official-documents/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/official-documents/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Pariġi, Settembru 2003. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.
- (14) Il-Kapitolu B.34 ta' dan l-Anness, Studju dwar it-tossicità riproduttiva ta' generazzjoni wahda.
- (15) Il-Kapitolu B.35 ta' dan l-Anness, Studju dwar it-tossicità riproduttiva ta' żewġ generazzjonijiet.
- (16) Il-Kapitolu B.43 ta' dan l-Anness, Studju dwar in-Newrotossicità fir-Rodituri.
- (17) Il-Kapitolu B.31 ta' dan l-Anness, Studju dwar it-tossicità tal-iżvilupp qabel it-twelid.
- (18) 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. ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33.
- (19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, Stati Uniti. Disponibbli fuq: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Ginevra. Disponibbli fuq: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
- (21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- (22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499-509.
- (23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38:2-6.
- (24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110-112.
- (25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 13:118-136.
- (26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- (27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- (28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- (29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87-94.
- (30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. *Toxicol. Sci.*, 49: 1-4.
- (31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- (32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433-439.

▼M5

- (33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449-457.
- (34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383-390.
- (35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350-365.
- (36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579-586.
- (37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298-303.
- (38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489-95.
- (39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- (40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67-100.
- (41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53-66.
- (42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37-82.
- (43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117-129.
- (44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247-260.
- (45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599-609.
- (46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405-411.
- (47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661-669.
- (48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589-591.
- (49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287-351
- (50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107-128.
- (51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181-211.

▼ M5

- (52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199-211.
- (53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25-30.
- (54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437-445.
- (55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125-145.
- (56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321-332.
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237-244.
- (59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98-105.
- (60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465-479.
- (61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47-60.
- (62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29-69.
- (63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60-90.
- (64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235-241.
- (65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387-399.
- (66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327-332.
- (67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342-352.
- (68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338-341.
- (69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122-131.
- (70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.
- (71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, Londra.

▼ M5

- (72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291-304.
- (73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123-130.
- (74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365-372.
- (75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745-755.
- (77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417-432.
- (78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129-135.
- (79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- (80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305-310.
- (81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262-268.
- (82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707-710.
- (83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51-61.
- (84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813-831.
- (85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113-121.
- (86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294-298.
- (87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3-41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70-74.

▼M5

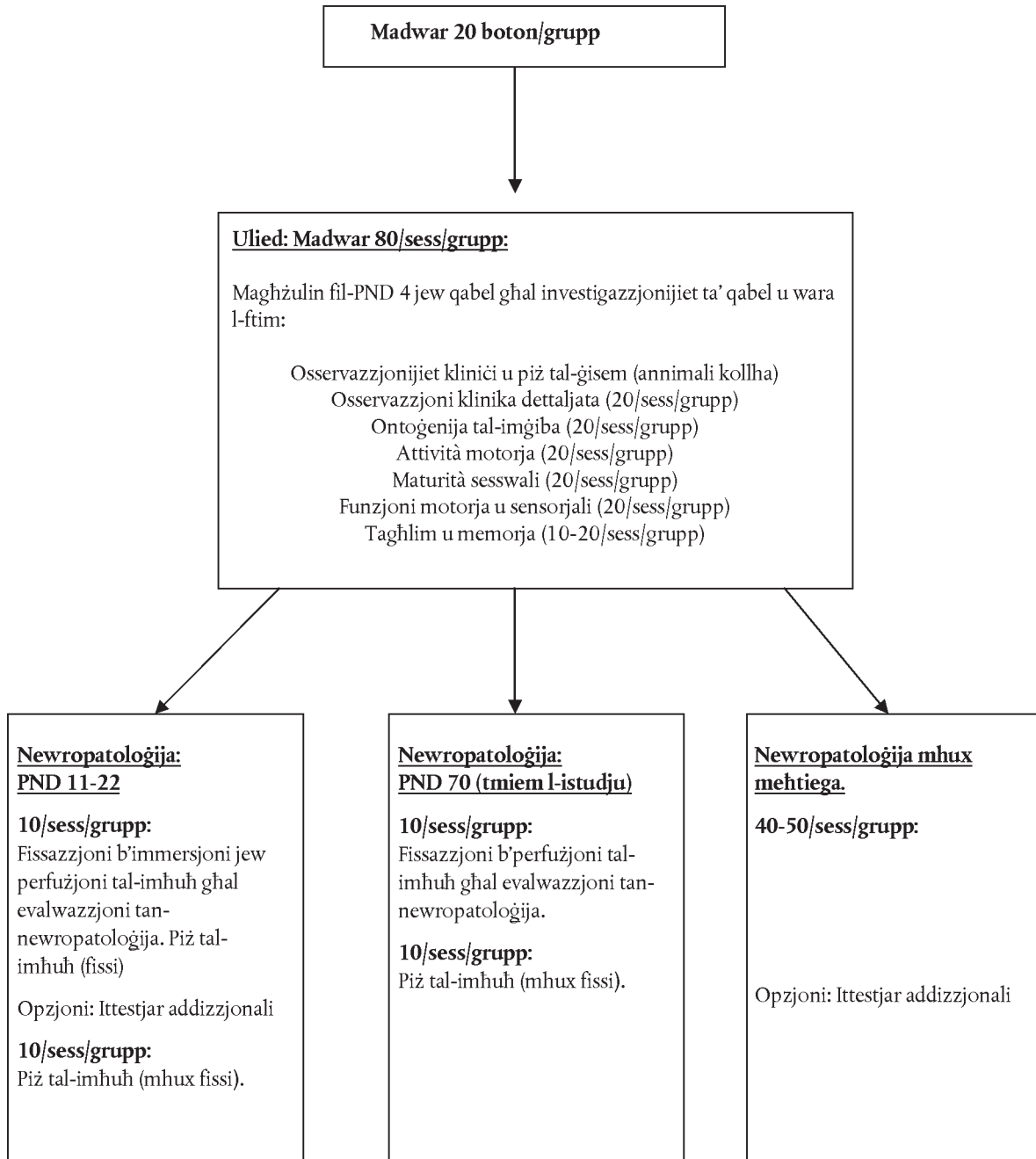
- (89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056–1060.
- (90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- (91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127-133.
- (92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401-405.
- (93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.
- (94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- (95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- (96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113-126.
- (97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21-27.
- (98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329-335.
- (99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165-172.
- (100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221-228.
- (101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587-90.
- (102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345-352.
- (103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296-313.
- (104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205-210.
- (105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295-301.
- (106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.
- (107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288-325.

▼ M5

- (108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.
- (109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼ **M5***Figura 1*

Skema ġenerali ta' ttestjar għat-testijiet funzjonali/tal-imġiba, evalwazzjoni tan-newropatoloġija, u l-piżijiet tal-mohh. Din id-dijagramma hija bbażata fuq id-deskrizzjoni fil-paragrafi 13-15 (PND = jum ta' wara t-twelid). L-eżempji tal-assenjament tal-annimali jingħataw fl-Appendiċi 1



▼ M5

Appendiċi 1

1. Eżempji ta' assenjamenti possibbli huma deskritti u mdahhlin fit-tabelli t'hawn taht. Dawn l-eżempji huma pprovduti biex jintwera li l-assenjament tal-annimali tal-istudju għal bosta paradigmi ta' ttestjar jista' jsir b'numru ta' modi differenti.

L-Ewwel Eżempju

2. Sett wiehed ta' 20 ferh/sess/livell ta' doża (jigifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jintuza għat-testijiet ta' qabel il-ftim tal-ontogenija tal-imġiba. Minn dawn l-annimali, 10 ifrieh/sess/livell ta' doża (jigifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jinqatlu b'mod dinjituż fil-PND 22. L-imħuħ jitnehhew, jintiznu u jiġu pproċessati għal evalwazzjoni istopatoloġika. Barra minn hekk, tiġabar dejta dwar il-piż tal-moħħ billi jintużaw imħuħ mill-10 irġiel u 10 nisa li jifdal għal kull livell ta' doża.
3. Sett ieħor ta' 20 animal/sess/livell ta' doża (jigifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jintuza għat-testijiet funzjonali/tal-imġiba ta' wara l-ftim (osservazzjonijiet kliniċi dettaljati, attività motorja, qatgħa awtidotjra u ttestjar tal-funzjoni konjittiva fl-adoloxxenti) u valutazzjoni tal-età tal-maturità sesswali. Minn dawn l-annimali, 10 animal/sess/livell ta' doża (jigifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton), jiġu anestetizzati u fissati permezz ta' perfużjoni fi tmiem l-istudju (madwar il-PND 70). Wara fissazzjoni addizzjonali in situ, il-moħħ jitneħħa u jiġi pproċessat għal evalwazzjoni newropatoloġika.
4. Għall-ittestjar tal-funzjoni konjittiva fiz-żgħażaġħ (eż., PND 60-70), jintuza t-tielet sett ta' 20 ferh/sess/livell ta' doża (jigifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton). Minn dawn l-annimali, 10 animal/sess/grupp (raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jinqatlu fi tmiem l-istudju u l-moħħ jitneħħa u jintizen.
5. L-20 animal/sess/grupp li jifdal jithallew għal testijiet addizzjonali possibbli.

Tabella 1

Nru tal-ferh ^(a)		Numru ta' frieh assenjati għat-test	Eżami/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f 10 m + 10 f 10 m + 10 f	Ontogenija tal-imġiba PND 22 piż tal-moħħ/newropatoloġija/morfometrija PND 22 piż tal-moħħ
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati Attività motorja Maturità sesswali Funzjoni motorja u sensorjali Tagħlim u memorja (PND 25) Piż tal-moħħ/newropatoloġija/morfometrija ta' annimali żgħażaġħ ~PND 70

▼ M5

Nru tal-ferh ^(a)		Numru ta' frieh assenjati ghat-test	Eżami/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Taghlim u memorja (żgħażaġh)
		10 m + 10 f	Piż tal-mohħ ta' annimali żgħażaġh ~ PND 70
4	8	—	Annimali ta' riżerva għal sostituti jew testijiet addizzjonali

^(a) Għal dan l-eżempju, il-boton jiġu separati u jitqassmu f4 irġiel + 4 nisa; il-frieh irġiel jingħataw in-numru 1 sa 4, il-frieh nisa minn 5 sa 8.

Eżempju 2

6. Sett wiehed ta' 20 ferh/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wiehed u mara waħda għal kull boton) jintuża għall-ittestjar ta' qabel il-ftim tal-ontogenija tal-imġiba. Minn dawn l-annimali, 10 frieh/sess/livell ta' doża (raġel wiehed u mara waħda għal kull boton), jinqatlu b'mod dinjituż fil-PND 11. L-imħuħ jitneħħew, jintiżnu u jiġu pproċessati għal evalwazzjoni istopatoloġika.
7. Sett ieħor ta' 20 animal/sess/livell ta' doża (raġel wiehed u mara waħda għal kull boton) jintuża għal eżamijiet ta' wara l-ftim (osservazzjonijiet kliniċi dettaljati, attività motorja, valutazzjoni tal-età ta' maturità sesswali u funzjoni motorja u sensorjali). Minn dawn l-annimali, 10 annimali/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wiehed u mara waħda għal kull boton) jiġu anestetizzati u fissati permezz ta' perfużjoni fi tmiem l-istudju (madwar il-PND 70). Wara fissazzjoni addizzjonali *in situ*, il-mohħ jitneħħa, jintiżen u jiġi pproċessat għal evalwazzjoni newropatoloġika.
8. Għall-ittestjar tal-funzjoni konjittiva f'annimali adoloxxenti u żgħażaġh, 10 frieh/sess/livell ta' doża jintużaw (jiġifieri raġel wiehed u mara waħda għal kull boton). Jintużaw annimali differenti għall-ittestjar għal testijiet tal-funzjoni konjittiva fil-PND 23 u żgħażaġh. Fi tmiem l-istudju, l-10 annimali/sess/grupp ittestjati bħala adulti jinqatlu, il-mohħ jitneħħa u jintiżen.
9. L-20 annimal/sess/grupp li jifdal li ma jingħažlux għall-ittestjar u jiġu skartati fil-ftim.

Tabella 2

Nru tal-ferh ^(a)		Nru ta' frieh assenjati ghat-test	Eżami/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogenija tal-imġiba
		10 m + 10 f	PND 11 piż tal-mohħ/newropatoloġija/morfometrija
2	6	20 m + 20 f	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati
		20 m + 20 f	Attività motorja
		20 m + 20 f	Maturità sesswali
		20 m + 20 f	Funzjoni motorja u sensorjali
		10 m + 10 f	Piż tal-mohħ/newropatoloġija/morfometrija ta' annimali żgħażaġh ~PND 70

▼ M5

Nru tal-ferh ^(a)		Nru ta' frieh assenjati ghat-test	Eżami/Test
m	f		
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Tagħlim u memorja (PND 23)
3	7	10 m + 10 f ^(b)	Tagħlim u memorja (zghażaġh) Piż tal-mohħ ta' annimali zghażaġh
4	8	—	Annimali maqtulin u skartati PND 21.

^(a) Għal dan l-eżempju, il-boton jiġu separati u jitqassmu f'4 irġiel + 4 nisa; il-frieh irġiel jingħataw in-numru 1 sa 4, il-frieh nisa minn 5 sa 8.

^(b) Il-frieh differenti jintużaw għal testijiet konjittivi fil-PND 23 u f'annimali zghażaġh (eż., boton żewġ/fard minn total ta' 20).

Eżempju 3

10. Sett wiehed ta' 20 ferh/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jintuża għall-valutazzjoni tal-piż tal-mohħ u n-newropatoloġija fil-PND 11. Minn dawn l-annimali, 10 frieh/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jinqatlu dinjituż fil-PND 11 u tnehhew, intiżnu u ġew ipproċessati 11-il mohħ għal evalwazzjoni istopatoloġika. Barra minn hekk, tingabar dejta dwar il-piż tal-mohħ billi jintużaw imħuħ mhux iffissati mill-10 annimali rġiel u nisa li jifdal għal kull livell ta' doża.
11. Sett ieħor ta' 20 annimal/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jintuża għall-ontogenija tal-imġiba (attività motorja), eżamijiet ta' wara l-flim (attività motorja u valutazzjoni tal-età tal-maturità sesswali), u ttestjar tal-funzjoni konjittiva fl-annimali adoloxenti.
12. Sett ieħor ta' 20 annimal/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jintuża għal testijiet tal-funzjoni motorja u sensorjali (qatgħa awditorja) u osservazzjonijiet kliniċi dettaljati. Minn dawn l-annimali, 10 annimali/sess/livell ta' doża (jiġifieri raġel wiehed jew mara wahda għal kull boton) jiġu anestizzati u ffissati permezz ta' perfużjoni fi tmiem l-istudju (madwar il-PND 70). Wara l-fissazzjoni addizzjonali *in situ*, il-mohħ jitneħħa, jintiżen u jiġi pproċessat għal evalwazzjoni newropatoloġika.
13. Sett ieħor ta' 20 ferh/sess/livell ta' doża jintuża għall-ittestjar tal-funzjoni konjittiva f'annimali zghażaġh (jiġifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton). Minn dawn, 10 annimali/sess/grupp (jiġifieri raġel wiehed u mara wahda għal kull boton) jinqatlu fi tmiem l-istudju, il-mohħ jitneħħa u jintiżen.

Tabella 3

Nru tal-ferh ^(a)		Nru ta' frieh assenjati ghat-test	Eżami/Test
m	f		
1	5	10 m + 10 f	PND 11 piż tal-mohħ/newropatoloġija/morfometrija
		10 m + 10 f	PND 11 piż tal-mohħ
2	6	20 m + 20 f	Ontogenija tal-imġiba (attività motorja)
		20 m + 20 f	Attività motorja
		20 m + 20 f	Maturità sesswali
		20 m + 20 f	Tagħlim u memorja (PND 27)

▼ **M5**

Nru tal-ferh ^(a)		Nru ta' frieh assenjati ghat-test	Eżami/Test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Qatgħa awditorja (adoloxxenti u żgħażaġh)
		20 m + 20 f	Osservazzjonijiet kliniċi dettaljati
		10 m + 10 f	Piż tal-mohħ/newropatoloġija/morfometrija ta' annimali żgħażaġh ~PND 70
4	8	20 m + 20 f	Tagħlim u memorja (annimali żgħażaġh)
		10 m + 10 f	Piż tal-mohħ ta' annimali żgħażaġh

^(a) Għal dan l-eżempju, il-boton jiġu separati u jitqassmu f'4 irġiel + 4 nisa; il-frieh irġiel jingħataw in-numru 1 sa 4, il-frieh nisa minn 5 sa 8.

▼ **M5**

Appendiċi 2

Definizzjonijiet:

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata billi jintuża dan il-metodu ta' ttestjar

▼ M5

B.54. BIJOASSAĠĠ UTEROTROFIKU F'RODITURI: TEST TA' TGHARBIL TA' TERMINU QASIR GHAL PROPRJETAJIET ESTROĠENIĠI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) tal-OECD Nru 440 (2007). L-OECD nediet attività ta' profil għoli fl-1998 sabiex jiġu riveduti l-linji gwida eżistenti u jiġu żviluppati linji gwida godda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' sustanzi potenzjali li jfixxlu s-sistema endokrinali (1). Element minnhom tal-attività kien li tiżviluppa linja gwida tat-test għal Bijoassaġġ Uterotrofiku ta' roditori. Imbagħad, il-Bijoassaġġ Uterotrofiku tar-roditori għaddha minn programm estensiv ta' validazzjoni inkluża l-kompi-lazzjoni ta' dokument ta' sfond dettaljat (2)(3) u t-tweqqif ta' studji estensivi fi hdan u bejn laboratorji biex jintwerew ir-relevanza u r-riproduċibbiltà tal-bijoassaġġ b'estroġen ta' referenza potenti, agonisti riċetturi dgħajfin tal-estroġen, antagonisti riċettur qawwi tal-estroġen, u sustanza kimika ta' referenza negattiva (4)(5)(6)(7)(8)(9). Dan il-metodu ta' ttestjar B.54 huwa r-riżultat tal-esperjenza miksuba matul il-programm tat-test ta' validazzjoni u r-riżultati miksubin fih b'agonisti estroġeniċi.
2. Il-Bijoassaġġ Uterotrofiku huwa test ta' tgħarbil b'terminu qasir li origina fis-snin tletin (27)(28) u ġie standardizzat għall-ewwel darba għat-tgħarbil minn kumitat tal-esperti fl-1962 (32)(35). Huwa msejjes fuq iż-żieda fil-piż uterin jew ir-rispons uterotrofiku (għal analiżi, ara 29). Jevalwa l-hila ta' sustanza kimika sabiex tnedi attivitajiet bijoloġiċi konsistenti ma' agonisti jew antagonisti ta' estroġeni naturali (eż. 17β-estradiol), madankollu, l-użu tagħha għall-identifikazzjoni ta' antagonist huwa ferm inqas komuni għall-agonisti. L-utru jirrispondi għal estroġeni b'żewġ modi. Rispons inizjali huwa żieda fil-piż minhabba imbibizzjoni ta' ilma. Dan ir-rispons huwa segwit minn żieda fil-piż minhabba tkabbir fit-tessut (30). Ir-rispons tal-utru f'firien u grieden huma komparabbli b'mod kwalitattiv.
3. Dan il-bijoassaġġ iservi bhala assaġġ *in vivo* u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuntest tal-“Qafas Kuncettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixxlu s-Sistema Endokrinali” (Appendiċi 2). F'dan il-Qafas Kuncettwali, il-Bijoassaġġ Uterotrofiku jinsab fil-Livell 3 bhala assaġġ *in vivo* li jipprovdi dejta dwar mekkaniżmu endokrinali uniku, jiġifieri l-estroġeniċità.
4. Il-Bijoassaġġ Uterotrofiku huwa maħsub sabiex ikun inkluż f'sensiela ta' testijiet *in vitro* u *in vivo* biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi b'potenzjal li jinteraġixxu mas-sistema endokrinali, li finalment iwasslu għal valutazzjoni tar-riskju għas-saħħa tal-bniedem jew l-ambjent. Il-programm ta' validazzjoni tal-OECD uża kemm agonisti b'saħħithom kif ukoll dgħajfin biex jevalwa l-prestazzjoni tal-assaġġ fl-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi (4)(5)(6)(7)(8). B'hekk, is-sensittività tal-proċedura tat-test għal agonisti tal-estroġen intweriet sew flimkien ma' riproduttibilità tajba intra u interlaboratorja.
5. Fir-rigward tal-kimiċi negattivi, fil-programm ta' valutazzjoni kienet inkluża biss sustanza kimika “negattiva” ta' referenza waħda li diġà kienet irrappor-tata negattiva minn assaġġ uterotrofiku kif ukoll tqabbad mar-riċettur *in vitro* u assaġġi ta' riċetturi, iżda giet evalwata dejta ohra dwar it-testijiet, mhux relatata mal-programm ta' validazzjoni tal-OECD, li komplet issostni l-ispe-ċifiċità tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku għat-tgħarbil ta' agonisti tal-estroġen (16).

▼M5

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

6. Agonisti u antagonisti tal-estrogen jaġixxu bħala ligandi għal riċetturi tal-estrogen α and β u jistgħu jattivaw jew jinibixxu, rispettivament, l-azzjoni transkrizzjonali tar-riċetturi. Dan jista' jkollu l-potenzjal li jwassal għal perikli tas-saħħa avversa, inklużi effetti fuq ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp. Għaldaqstant, hemm il-bżonn li sustanza kimika tiġi vvalutata u evalwata bħala agonista jew antagonista possibbli tal-estrogen. Filwaqt li informattiva, l-affinità ta' ligand għal riċettur tal-estrogen jew attivazzjoni transkrizzjonali ta' ġeni rapportaturi *in vitro* hija wahda mill-bosta determinanti ta' periklu possibbli. Determinanti oħrajn jistgħu jinkludu attivazzjoni u diżattivazzjoni metabolika malli jidhlu fil-ġisem, distribuzzjoni f'tessuti fil-mira, u tnehhija mill-ġisem, xi haġa li tal-inqas tiddependi b'mod parzjali fuq ir-rotta tal-amministrazzjoni u s-sustanza kimika li tkun qed tiġi ttestjata. Dan iwassal għall-bżonn li titgħarbel l-attività possibbli ta' sustanza kimika *in vivo* f'kundizzjonijiet rilevanti, sakemm il-karatteristiċi dwar is-sustanza kimika rigward l-Assorbiment — id-Distribuzzjoni — il-Metabolizmu — l-Eliminazzjoni (ADME) ma jkunux diġà pprovdew l-informazzjoni xierqa. It-tessuti tal-utri jirrispondu bi tkabbir mgħagħel u qawwi għall-istimolu mill-estrogeni, b'mod partikolari f'roditori tal-laboratorju, li għandhom ciklu estruż li jidm madwar 4 ijiem. Speċi ta' roditori, b'mod partikolari l-firien, spiss jintużaw fi studji dwar it-tossicità għal karatterizzazzjoni tal-periki. Għaldaqstant, l-utru tar-roditori huwa organu mira xieraq għat-tgħarbil *in vivo* ta' agonisti u antagonisti tal-estrogen.

7. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq dawk il-protokollu mhaddmin fl-istudju ta' validazzjoni tal-OECD li ntweri li huwa affidabbli u ripetibbli fi studji intra u interlaboratorji (5)(7). Bhalissa, hemm żewġ metodi disponibbli, jiġifieri l-metodu tal-annimal mara adulta b'ovarettomija (metodu ovx-adult) u l-metodu tal-annimal mara immatura mingħajr ovarettomija (metodu immatur). Fil-programm tat-test ta' validazzjoni tal-OECD intweri li ż-żewġ metodi għandhom sensitività u riproducibbiltà paragonabbli. Madankollu, l-immatur, peress li għandu assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG) intatt, huwa kemxejn inqas speċifiku iżda jkopri ambitu usa' ta' investigazzjoni mill-annimal ovarettomjat għaliex kapaċi jwieġeb għal sustanzi kimiċi li jinteragixxu mal-assi HPG minflok ir-riċettur tal-estrogen biss. L-assi HPG tal-far huwa funzjonali fl-età ta' madwar 15-il jum. Qabel din, il-pubertà ma tistax tithaffef b'kuri bħal GnRH. Malli l-annimali nisa jibdw jilhq l-pubertà, qabel il-ftuħ vaginali, l-annimali nisa ser ikollhom cikli silenżjużi li ma jirriżultawx fi ftuħ vaginali jew ovulazzjoni, iżda hemm xi bidliet ormonali. Jekk sustanza kimika tistimola l-assi HPD b'mod dirett jew indirett, jirriżultaw pubertà prekoċi, ovluzzjoni bikrija u ftuħ vaginali mgħagħel. Mhux biss is-sustanzi kimiċi li jaġixxu fuq l-assi HPG jaġhmlu dan iżda ċerti dieti b'livelli oghla ta' enerġija metabolizzabbli minn oħrajn ser jistimolaw it-tkabbir u jhaffu l-ftuħ vaginali bla ma jkunu estrogeniċi. It-tali sustanzi kimiċi ma jinduċux rispons uterotrofu f'annimali adulti OVX peress li l-assi HPG tagħhom ma jahdimx.

8. Għal raġunijiet ta' benessri tal-annimali, għandha tingħata preferenza lill-metodu billi jintużaw firien immaturi, billi tiġi evitata kura ta' qabel il-kirurgija tal-annimali u jiġi evitat nuqqas ta' użu possibbli ta' dawk l-annimali li jindikaw kwalunkwe evidenza ta' dhul fil-fażi estruża (ara l-paragrafu 30).

▼ M5

9. Ir-rispons uterotrofik u mhuwiex kompletament ta' oriġini estrogenika, jiġifieri sustanzi kimiċi li mhuwiex agonisti jew antagonisti ta' estrogeni jistgħu jipprovdu rispons ukoll. Pereżempju, dożi relattivament għoljin ta' progesteron, testosterone, jew diversi progestini sintetiċi kollha jistgħu jwasslu għal rispons stimolattiv (30). Kwalunkwe rispons jista' jkun analizzat b'mod istoloġiku għal keratinizzazzjoni u kornifikazzjoni tal-vaġina (30). Tkun xi tkun l-oriġini possibbli tar-rispons, riżultat pożittiv ta' Bijoassaġġ Uterotrofik normalment għandu jniedi azzjonijiet għal iktar kjarifika. Evidenza addizzjonali tal-estrogeniċità tista' tiġi minn assaġġi *in vitro*, bħall-assaġġi li jaqbd mal-ER u assaġġi ta' attivazzjoni transkrizzjonali, jew minn assaġġi *in vivo* oħrajn bħall-assaġġ tal-pubertà tal-annimali nisa.

10. Peress li l-Bijoassaġġ Uterotrofik jservi bħala assaġġ tat-tgħarbil *in vivo*, l-approċċ ta' validazzjoni meħud qeda kemm kunsiderazzjonijiet relatati mal-benessri tal-annimali kif ukoll strateġija ta' ttestjar b'saffi. Għal dan l-ghan, sar sforz biex jiġu vvalidati b'mod rigoruż ir-riproduċibilità u s-sensittività għall-estrogeniċità — it-tassib ewlieni għal ħafna sustanzi kimiċi-, filwaqt li f'tit li xejn sar sforz fir-rigward tal-komponent tal-antiestrogeniċità tal-assaġġ. Huwa biss antiestrogen wieħed b'attività b'saħħitha li gie ttestjat peress li n-numru ta' sustanzi kimiċi bi profil antiestrogeniku ċar (mhux oskurat minn xi attività estrogenika) huwa ferm limitat. B'hekk, dan il-metodu ta' ttestjar huwa ddedikat għall-protokoll estrogeniku, filwaqt li l-protokoll li jiddeskrivi l-modalità antagonista tal-assaġġ huwa inkluz f'Dokument ta' Gwida (37). Ir-riproduċibilità u s-sensittività tal-assaġġ għas-sustanzi kimiċi b'attività purament antiestrogenika ser ikunu definiti b'mod iktar ċar iktar 'il quddiem, wara li l-proċedura tat-test tkun dahlet fir-rutina tal-użu għal ċertu żmien u jkunu ġew identifikati iktar sustanzi kimiċi b'din il-modalità ta' azzjoni.

11. Huwa rikonoxxut li l-proċeduri kollha bbażati fuq annimali ser jikkonformaw mal-istandards lokali tal-indukrar tal-annimali; id-deskrizzjonijiet tal-indukrar u l-kura stabbiliti hawn taht huma standards minimi tal-prestazzjoni, u ser ikunu sostitwiti minn regolamenti lokali bħad-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 (38). Gwida ulterjuri dwar it-trattament umanitarju tal-annimali tingħata mill-OECD (25).

12. Bħal bl-assaġġ kollha li jużaw annimali haġġin, importanti li jkun żgurat li d-dejta hija verament neċessarja qabel ma jinbda l-assaġġ. Pereżempju, żewġ kundizzjonijiet li fihom tista' tkun meħtieġa d-dejta huma:
 - potenzjal għoli ta' esponiment (Livell 1 tal-Qafas Kuncettwali, Appendiċi 2) jew indikazzjonijiet għal estrogeniċità (Livell 2) biex jiġi investigat jekk it-tali effetti jistgħux isehħu *in vivo*,
 - effetti li jindikaw estrogeniċità f'testijiet *in vivo* tal-Livell 4 jew 5 biex ikun sostanzjat li l-effetti kienu relatati ma' mekkanizmu estrogeniku li ma jistax jintwera permezz ta' test *in vitro*.

13. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

▼ **M5****IL-PRINĊIPJU TAT-TEST**

14. Il-Bijoassagg Uterotrofiku jiddependi għas-sensittività tiegħu fuq sistema ta' ttestjar tal-annimali li fiha l-assi ipotalamiku-pitwitarju-ovarju mhuwiex funzjonali, xi haġa li twassal għal livelli endoġeni baxxi ta' estrogen li jiċċirkola. Dan ser jiżgura piż uterin bażi baxx u medda massima ta' rispons għal estrogeni amministrati. Żewġ stati sensittivi tal-estrogen fir-roditur mara jissodisfaw dan ir-rekwiżit:

(i) annimali nisa immaturi wara l-ftim u qabel il-pubertà, u

(ii) annimali nisa żgħażaġh wara ovarettomija b'hin adegwat sabiex it-tessuti tal-utri jagħmlu rigress.

15. Is-sustanza kimika tat-test tingħata kuljum permezz ta' gavage orali jew tilqima taht il-ġilda. Dożi tas-sustanza kimika tat-test gradwati jingħataw lil minimu ta' żewġ gruppi tal-kura (ara l-paragrafu 33 għal gwida) ta' annimali sperimentali billi jintuza livell wiehed ta' doża għal kull grupp u perjodu ta' għoti ta' tliet ijiem konsekuttivi għal metodu immatur u perjodu ta' għoti minimu ta' tliet ijiem konsekuttivi għall-metodu adulti ovx. L-annimali huma nekropsjati madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża. Għal agonisti tal-estrogen, il-piż uterin medju tal-gruppi ta' annimali kkurati fir-rigward tal-grupp veikolu huwa vvalutat għal zieda statistikament importanti. Zieda statistika-ment importanti fil-piż uterin medju ta' grupp tat-test tindika rispons pożittiv f'dan il-bijoassagg.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Għażla tal-ispeċi ta' annimali**

16. Jistgħu jintużaw razez ta' roditori tal-laboratorju użati spiss. Bħala eżempju, matul il-validazzjoni intużaw ir-razez Sprague-Dawley u Wistar ta' firien. Razez b'utri magħrufin jew suspettati li huma inqas risponsivi ma għandhomx jintużaw. Il-laboratorju għandu juri s-sensittività tar-razza użata kif deskritta fil-paragrafi 26 u 27.

17. Il-far u l-ġurdien intużaw spiss fil-Bijoassagg Uterotrofiku sa mis-snin tletin. L-istudji ta' validazzjoni tal-OECD saru biss b'firien fuq il-baži ta' fehim li ż-żewġ speċi huma mistennija jkunu ekwivalenti u għalhekk, speċi wahda tkun biżżejjed għall-validazzjoni madwar id-dinja sabiex jiġu ffrankati riżorsi u annimali. Il-far huwa l-ispeċi tal-għażla f'hafna mill-istudji dwar it-tossicità riproduttiva u tal-iżvilupp. Peress li teżisti database storika vasta għal firien u, għalhekk, sabiex jitwessa' l-ambitu tal-metodu ta' ttestjar tal-Bijoassagg Uterotrofiku f'roditori għall-użu ta' ġrieden bħala speċi tat-test, sar studju limitat ta' validazzjoni ta' segwitu fil-ġrieden (16). Inghazel approċċ komparattiv b'numru limitat ta' sustanzi kimiċi tat-test, laboratorji li jiehdu sehem u mingħajr ittestjar ta' kampjun kodifikat sabiex jinżamm l-iskop oriġinali biex jiġu ffrankati riżorsi u annimali. Dan l-istudju komparattiv ta' validazzjoni juri għall-Bijoassagg Uterotrofiku fi ġrieden ovarjettomizzati żgħażaġh li, b'mod kwalitattiv u kwantitattiv, id-dejta miksuba f'firien u ġrieden jikkorrispondu sew għal xulxin. Meta r-riżultat tal-Bijoassagg Uterotrofiku jista' jkun preliminarju għal studju fit-tul, dan jippermetti sabiex fiż-żewġ studji jintużaw annimali mill-istess razza u sors. L-approċċ komparattiv kien limitat għall-ġrieden OVX u r-rapport ma jipprovdix dejta robusta stabbilita biex jiġi vvalidat il-mudell immatur, u b'hekk il-mudell immatur għall-ġrieden mhuwiex ikkunsidrat taht il-kamp ta' applikazzjoni tal-metodu ta' ttestjar kurrenti.

▼M5

18. B'hekk, f'xi kazijiet, jistghu jintużaw grieden minflok firien. Ghandha tinghata gustifikazzjoni ghal din l-ispeċi, fuq il-bażi ta' kriterji tossikoloġiċi, farmakokinetiċi u/jew oħrajn. Jista' jkun hemm bżonn ta' modifiki tal-protokoll għall-grieden. Pereżempju, il-konsum ta' ikel tal-grieden fuq bażi tal-piż tal-gisem huwa oġġa minn dak tal-firien u, għaldaqstant, il-kontenut ta' fitoestrogen fl-ikel għandu jkun inqas għall-grieden milli għall-firien (9)(20)(22).

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-ghalf

19. Il-proċeduri kollha għandhom jikkonformaw ma' standards lokali ta' indukrar tal-annimali tal-laboratorju. Dawn id-deskrizzjonijiet tal-indukrar u l-kura huma standards minimi u ser ikunu sostitwiti minn regolamenti lokali bħad-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 (38). It-temperatura fil-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 °C (b'medda ta' madwar ± 3 °C). L-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma għandhiex taqbeż massimu ta' 70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra. Il-mira għandha tkun umdità relattiva ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali. Is-sekwenza tad-dawl ta' kuljum għandha tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam.
20. Id-dieta tal-laboratorju u l-ilma tax-xorb għandhom ikunu pprovduti *ad libitum*. L-annimali żgħażaġh jistghu jitrabbew f'post b'mod individwali jew jitqiegħdu f'gagġa fi gruppi li jaslu sa tliet annimali. Minhabba l-età żgħira tal-annimali immaturi, huwa rakkomandat li jitrabbew fi grupp soċjali.
21. Il-livelli għoljin ta' fitoestrogeni f'dieti tal-laboratorju huma magħrufin li jżidu l-piżijiet uterini fir-roditori sa grad għolji biżżejjed li jxekkel il-Bijoassagġ Uterotrofiku (13)(14)(15). Livelli għoljin ta' fitoestrogeni u ta' enerġija metabolizzabbli f'dieti tal-laboratorju jistghu jirrizultaw f'pubertà bikrija wkoll, jekk jintużaw annimali immaturi. Il-preżenza ta' fitoestrogeni tirriżulta primarjament mill-inklużjoni ta' prodotti tas-sojja u tal-alfalfa fid-dieti tal-laboratorju u ntwerja li konċentrazzjonijiet ta' fitoestrogeni jvarjaw minn lott għal iehor ta' dieti standard tal-laboratorju (23). Il-piż tal-gisem huwa varjabbli importanti, peress li l-kwantità ta' ikel ikkonsmat huwa relatat mal-piż tal-gisem. Għalhekk, id-doża propja ta' fitoestrogen ikkonsmata mill-istess dieta tista' tvarja bejn speċi u skont l-età (9). Għal firien nisa immaturi, il-konsum tal-ikel fuq bażi ta' piż tal-gisem jista' jkun bejn wiehied u iehor id-doppju dak ta' firien adulti żgħażaġh b'ovarettomija. Għal grieden żgħażaġh, il-konsum tal-ikel fuq bażi tal-piż tal-gisem jista' jkun bejn wiehied u iehor erba' darbiet dak ta' firien żgħażaġh nisa b'ovarettomija.
22. Madankollu, ir-riżultati tal-Bijoassagġ Uterotrofiku (9)(17)(18)(19) juru li kwantitajiet limitati ta' fitoestrogeni djetetiċi huma aċċettabbli u ma jnaqqasux is-sensittività tal-bijoassagġ. Bħala gwida, livelli djetetiċi ta' fitoestrogeni ma għandhomx jaqbuż it-350 µg tal-ekwivalenti ta' genistein/gramma tad-dieta tal-laboratorju għal firien nisa immaturi Sprague Dawley u Wistar (6)(9). Dawn id-dieti għandhom ikunu xierqa wkoll meta jiġu ttestjati f'firien żgħażaġh b'ovarettomija għaliex il-konsum tal-ikel fuq bażi ta' piż tal-gisem huwa inqas f'żgħażaġh meta mqabbel ma' annimali immaturi. Jekk ser jintużaw grieden adulti b'ovarettomija jew firien iktar sensittivi għal fitoestrogeni, għandu jiġi kkunsidrat tnaqqis proporzjonat fil-livelli tal-fitoestrogen fid-dieta (20). Barra minn hekk, id-differenzi f'enerġija metabolika disponibbli minn dieti differenti jistghu jwasslu għal qabżiet fiż-żmien għall-bidu tal-pubertà (21)(22).

▼ M5

23. Qabel l-istudju, hemm bżonn li ssir għażla bir-reqqa ta' dieta minghajr livell għoli ta' fitoestrogeni (għal gwida ara (6)(9)) jew enerġija metabolizzabbli, li tista' tfixx ir-riżultati (15)(17)(19)(22)(36). L-iżgurar tal-prestazzjoni xierqa tas-sistema tat-test użata mil-laboratorju kif speċifikat fil-paragrafi 26 u 27 huwa kontroll importanti fuq dawn iż-żewġ fatturi. Bħala salvagwardja konsistenti ma' Prattika tajba tal-laboratorju (GLP) għandu jsir kampjunar rappreżentattiv ta' kull lott ta' dieta mogħtija matul l-istudju għal analiżi possibbli ta' kontenut fitoestrogeni (eż. fil-każ ta' piż ta' kontroll uterin għoli relatat ma' kontrolli storiċi jew rispons inadegwat għall-estrogen ta' referenza, 17 alfa etinil estradiol). L-alikwoti għandhom jiġu analizzati bħala parti mill-istudju jew jiġu ffrizati f' -20 °C jew b'tali mod li jipprevjenu milli l-kampjun jiddekomponi qabel l-analiżi.
24. Ċerti materjali tas-sodod jista' jkun fihom sustanzi kimiċi estrogeniċi jew antiestrogeniċi li jsejtnu b'mod naturali (eż. iċ-ċifċiegha tal-qamhrrun hija magħrufa li taffettwa ċ-ċikličità tal-firien u tidher li hija antiestrogenika). Il-materjal tas-sodda magħżul għandu jkun fih livell minimu ta' fitoestrogeni.

Preparazzjoni tal-annimali

25. Annimali sperimentali minghajr evidenza ta' xi marda jew anormalità fiżika jingħazlu b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u tal-kura. Il-gaġeġ għandhom jiġu rranġati b'tali mod li jkunu minimizzati l-effetti possibbli dovuti għat-tqegħid tal-gaġeġ. L-annimali għandhom jiġu identifikati b'mod uniku. Idealment, annimali immaturi għandhom jitqiegħdu f'gaġeġ ma' ommijiet jew ommijiet adottivi sal-ftim matul l-akklimatizzazzjoni. Il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni qabel il-bidu tal-istudju għandu jkun ta' madwar 5 ijiem għal annimali żgħażaġh u għal annimali immaturi ma' ommijiet jew ommijiet adottivi. Jekk l-annimali immaturi jinkisbu bħala annimali li għadhom kif infatmu minghajr ommijiet, jista' jkun hemm bżonn ta' durata iqsar tal-perjodu ta' akklimatizzazzjoni peress li d-dożaġġ għandu jibda eżatt wara l-ftim (ara l-paragrafu 29).

PROCEDURA**Verifika tal-Profiċjenza tal-Laboratorju**

26. Jistgħu jintużaw żewġ għażliet differenti biex tiġi verifikata l-profiċjenza tal-laboratorju:

— Verifika perijodika, li tiddependi fuq studju bażi inizjali ta' kontrolli pożittivi (ara l-paragrafu 27). Tal-inqas kull 6 xhur u kull darba li jkun hemm bidla li tista' tinfluwenza l-prestazzjoni tal-assaġġ (eż. formulazzjoni ġdida tad-dieta, bidla fil-persunal li jagħmel dissezjonijiet, bidla fir-razza jew il-fornituri tal-annimali, eċċ), ir-risponsività tas-sistema tat-test (mudell tal-annimal) għandha tiġi verifikata billi tintuża doża xierqa (fuq il-bażi tal-istudju bażi ta' kontrolli pożittivi deskritti fil-paragrafu 27) ta' estrogen ta' referenza: 17 α -etinil estradiol (Nru tas-CAS 57-63-6) (EE),

— L-użu ta' kontrolli konkurrenti, billi jiġi inkluz grupp mogħti doża xierqa ta' estrogen ta' referenza f'kull assaġġ.

Jekk is-sistema ma twegħibx kif mistenni, il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu eżaminati u modifikati kif xieraq. Huwa rakkomandat li d-doża ta' estrogen ta' referenza tintuża f'wieħed mill-approċċi tkun ta' madwar ED70 sa 80.

▼ M5

27. **Studju Baži ta' Kontroll Pozittiv** — Qabel ma laboratorju jwettaq studju b'dan il-metodu ta' ttestjar għall-ewwel darba, il-profiċjenza tal-laboratorju għandha tintwera billi tiġi ttestjata r-risponsività tal-mudell tal-annimal, billi jiġi stabbilit ir-rispons tad-doża ta' estrogen ta' referenza: 17 α -etinil estradijoli (Nru tas-CAS 57-63-6) (EE) b'minimu ta' erba' dozi. Ir-rispons tal-piż uterin ser jitqabbel ma' dejta storika stabbilita (ara r-referenza (5)). Jekk dan l-istudju baži ta' kontroll pozittiv ma jrendix ir-riżultati antiċipati, il-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu eżaminati u modifikati.

In-numru u l-kundizzjoni tal-annimali

28. Kull grupp ikkurat u ta' kontroll għandu jkun fih tal-inqas 6 annimali (kemm għall-protokoll tal-metodu immatur kif ukoll dak tal-adulti ovx).

L-età tal-annimali immaturi

29. Għall-Bijoassaggi Uterotrofiku b'annimali immaturi, irid ikun speċifikat il-jum tat-twelid. Id-dożaġġ għandu jibda kmieni biżżejjed sabiex jiġi żgurat li, fi tmien l-ghoti tas-sustanza kimika tat-test, tkun għadha ma sehhitx iż-żieda fiżjoloġika tal-estrogeni endoġenu assoċjata mal-pubertà. Min-naha l-oħra, hemm evidenza li annimali żgħar hafna jistgħu jkunu inqas sensittivi. Għad-definizzjoni tal-età ottimali, kull laboratorju għandu jiehu f'kunsiderazzjoni d-dejta ta' sfond tiegħu stess fuq il-maturità.

Bħala gwida ġenerali, id-dożaġġ fil-firien jista' jibda minnufih wara l-ftim bikri fil-jum 18 ta' wara t-twelid (bil-jum tat-twelid li jkun il-jum 0 ta' wara t-twelid). Idealment, id-dożaġġ fil-firien għandu jitlesta fil-jum 21 ta' wara t-twelid iżda dejjem qabel il-jum 25 ta' wara twelid għax, wara din l-età, l-assi ipotalamiku-pituitarju-ovarju jsir funzjonali u l-livelli ta' estrogen endoġenu jistgħu jibdeu jiżiedu b'żieda konkomitanti fil-medji tal-piż uterin baži u zieda fid-devjazzjonijiet standard tal-grupp (2)(3)(10)(11)(12).

Proċedura għal ovarettomija

30. Għall-far u l-ġurdien mara b'ovarettomija (gruppi ta' trattament u kontroll), l-ovarettomija għandha ssir fl-età ta' bejn 6 u 8 ġimgħat. Għall-firien, għandhom ikunu għaddew tal-inqas 14-il jum bejn l-ovarettomija u l-ewwel jum ta' għoti sabiex l-utri jkun jista' jagħmel rigress għal linja baži stabbli minima. Għall-ġrieden, għandhom jgħaddu tal-inqas 7 ijiem bejn l-ovarettomija u l-ewwel jum ta' għoti. Peress li ammonti żgħar ta' tessut tal-ovarji huma biżżejjed biex jiġu prodotti livelli ċirkolanti sinifikanti ta' estrogeni (3), l-annimali għandhom jiġu ttestjati qabel l-użu billi jiġu osservati ċelloli epitelljali kampjunati bit-tajjar mill-vagina f'tal-inqas hamest ijiem konsekuttivi (eż., il-jiem 10-14 wara l-ovarettomija għall-firien). Jekk l-annimali jindikaw xi evidenza ta' dhul fil-perjodu estruż, l-annimali ma għandhomx jintużaw. Barra minn hekk, fin-nekropsija, il-kampjuni tal-ovarji għandhom jiġu eżaminati għal xi evidenza tal-preżenza tat-tessut tal-ovarji. Jekk iva, l-annimal ma għandux jintuza fil-kalkoli (3).

31. Il-proċedura tal-ovarettomija tibda bl-annimal fir-rikombenza ventrali wara li l-annimal jiġi anestetizzat kif xieraq. Il-qasma li tiftaħ il-hajt tal-addome dorsolaterali għandha tkun ta' madwar 1 cm u parallela fil-punt nofsani bejn il-limitu inferjuri kostali u l-qoxra iljaka, u f'tit millimetri laterali mill-margni laterali tal-muskolu lombari. L-ovarju għandu jinqala' fejn jiltaqgħu l-kanal salovarju u l-korp uterin. Wara l-konferma li ma jkun hemm ebda fsad qawwi, il-hajt tal-addome għandu jingħalaq bil-hjata u l-ġilda għandha tingħalaq permezz ta' autoclips jew hjata xierqa. Il-punti tal-lega jintwerew b'mod skematiku fil-Figura 1. Għandha tintuza analġeżija xierqa ta' wara l-operazzjoni kif rakkomandat minn veterinarju b'esperjenza fl-indukrar ta' rodituri.

▼ M5

Piż tal-gisem

32. Fil-metodu tal-adulti ovx, il-piż tal-gisem u l-piż uterin mhumie x korrelatati għaliex il-piż uterin huwa affettwat minn ormoni bħal estrogeni iżda mhux mill-fatturi ta' tkabbir li jirregolaw id-daqs tal-gisem. Min-naħa l-oħra, il-piż tal-gisem huwa relatat mal-piż uterin fil-mudell immatur, waqt li jkun qed jimmatura (34). B'hekk, fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali użati, fil-mudell immatur, għandha tkun minima u ma taqbiżx $\pm 20\%$ tal-piż medju. Dan ifisser li d-daqs tal-boton għandu jkun standardizzat minn min jgħammar, biex jiġi żgurat li l-ulied ta' annimali minn ommijiet differenti ser jitgħalfu bejn wiehied u iehor l-istess. L-annimali għandhom jiġu assenjati fi gruppi (kemm kontroll kif ukoll kura) permezz ta' distribuzzjoni tal-piż aleatorja, sabiex il-piż medju tal-gisem ta' kull grupp ma jkunx statistikament differenti minn kwalunkwe grupp iehor. Għandha tinghata kunsiderazzjoni biex jiġi evitat l-assenjament ta' shab boton fl-istess grupp tal-kura sa fejn dan ikun prattikabbli bla ma jiżdied in-numru ta' boton li għandhom jintużaw għall-investigazzjoni.

Dożaġġ

33. Sabiex jiġi stabbilit jekk sustanza kimika tat-test jistax ikollha azzjoni estrogenika *in vivo*, żewġ gruppi ta' doża u kontroll normalment ikunu biżżejjed u għalhekk, dan il-metodu huwa ppreferut għal raġunijiet marbuta mal-benessri tal-annimali. Jekk l-iskop huwa li jew tinkiseb kurva ta' rispons għad-doża jew li ssir estrapolazzjoni għal doži inqas, hemm bżonn ta' tal-inqas 3 gruppi ta' doża. Jekk ikun hemm bżonn ta' informazzjoni minbarra l-identifikazzjoni ta' attività estrogenika (bħal stima tal-potenza), għandha tiġi kkunsidrata skeda differenti tad-dożaġġ. Hlief għall-kura bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp tal-kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-sugġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu fl-ghoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-istess ammont ta' veikolu użat mal-gruppi kkurati (jew l-oghla volum użat mal-gruppi tat-test jekk ikun differenti bejn il-gruppi).
34. F'dan il-każ, l-għan tal-Bijoassaġġ Uterotrofiku huwa li jingħazlu doži li jiżguraw sopravvivenza tal-annimali u li huma mingħajr tossiċità sinifikanti jew diffikultà għall-annimali wara tliet ijiem konsekuttivi ta' għoti tas-sustanza kimika sa doża massima ta' 1 000 mg/kg/jum. Il-livelli kollha ta' doża għandhom jiġu proposti u jingħazlu filwaqt li tittiehed f'kunsiderazzjoni kwalunkwe dejta (tossiko) kinetika u dwar it-tossiċità eżistenti disponibbli għas-sustanza kimika tat-test jew materjali relatati. L-oghla livell ta' doża għandu l-ewwel nett jiehu f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni dwar l-LD50 u/jew it-tossiċità akuta sabiex jiġu evitati mewt, tbatija severa jew diffikultà fl-annimali (24)(25)(26). L-oghla doża għandha tirrappreżenta d-doża massima tollerata (MTD); studju li jsir fl-livell tad-doża li kkaġuna rispons uterotrofiku pożittiv tkun aċċettata wkoll. Għat-tgharbil, intervalli kbar (eż. unitajiet ta' nofs log li jikkorrispondu għal progressjoni tad-doża ta' 3,2 jew anki sa unitajiet ta' log wahda) bejn dożaġġi ġeneralment huma aċċettabbli. Jekk ma jkun hemm ebda dejta xierqa disponibbli, jista' jitwettag studju ta' sejbiel tal-medda biex jgħin fid-determinazzjoni tad-doži li għandhom jintużaw.
35. Inkella, jekk il-potenza estrogenika ta' agonist tista' tiġi stmata permezz ta' dejta *in vitro* (jew *in silico*), din tista' tiġi kkunsidrata għall-għażla tad-doża. Pereżempju, l-ammont tas-sustanza kimika tat-test li tipproduci rispons uterotrofici ekwivalenti għall-agonist ta' referenza (etinil estradiol) huwa stmat mill-potenzi *in vitro* relattivi tiegħu għal etinil estradiol. L-oghla doża tat-test tinghata permezz ta' multiplikazzjoni ta' din id-doża ekwivalenti b'fattur xieraq, eż. 10 jew 100.

▼ M5

Kunsiderazzjonijiet ghas-sejbien tal-medda

36. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jsir studju preliminari ta' sejbien tal-medda bi ftit annimali. F'dan ir-rigward, id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 19 (25) jista' jintuża biex jiġu definiti s-sinjali kliniċi li jindikaw tossiċità jew diffikultà tal-annimali. Jekk fattibbli fi hdan dan l-istudju ta' sejbien tal-medda wara tliet ijiem ta' għoti, l-utri jistgħu jinqatgħu u jintiżnu madwar 24 wara l-aħħar doża. Imbagħad din id-dejta tkun tista' tintuża biex tassisti fid-disinn tal-istudju ewlieni (aġġużel doži massimi u inferjuri aċċettabbli u rrakkomanda n-numru ta' gruppi tad-doża).

L-għoti ta' doži

37. Is-sustanza kimika tat-test tingħata permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda. Iridu jitqiesu kunsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali kif ukoll aspetti tossikoloġiċi bħar-relevanza għar-rotta ta' esponiment tal-bniedem ghas-sustanza kimika (eż. gavage orali biex tiġi simulata ingestjoni, tilqima taħt il-ġilda biex jiġi simulat tehid man-nifs jew adsorbiment dermal), il-proprietajiet fiżiċi/kimiċi tal-materjal tat-test u speċjalment informazzjoni tossikoloġika eżistenti u dejta dwar il-metabolizmu u l-kinetika (eż. il-bżonn li jiġi evitat metabolizmu first pass, effiċjenza aħjar b'rotta partikolari) meta tingħażel ir-rotta tal-amministrazzjoni.
38. Huwa rakkomandat li, fejn ikun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni milwiema. Izda peress li hafna mil-liganti tal-oestrogeni jew il-prekursuri metabolici tagħhom għandhom it-tendenza li jkunu odrofobiċi, l-iktar approċċ komuni huwa li tintuża soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamħirrun, tal-karawett, tal-gunglien jew taz-zebbuġa). Madankollu, dawn iż-żjut għandhom kontenut kaloriku u ta' xaħam differenti, u b'hekk il-veikolu jista' jaffettwa l-konsum ta' enerġija metabolizzabbli (ME) totali, u b'hekk potenzjalment jibdel il-punti aħħarin imkejlin bħall-piż uterin, speċjalment fil-metodu immatur (33). B'hekk, qabel l-istudju, kwalunkwe veikolu li għandu jintuża għandu jiġi ttestjat fl-isfond tal-kontrolli bla veikoli. Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinhallu f'ammont minimu ta' 95 % etanol jew solventi xierqa oħrajn u dilwiti għall-koncentrazzjonijiet tal-hidma finali fil-veikolu tat-test. Il-karatteristiċi tossiċi tas-solvent iridu jkunu magħrufin, u għandhom jiġu ttestjati fi grupp ta' kontroll separat bis-solventi biss. Jekk is-sustanza kimika tat-test titqies stabbli, tista' tintuża azzjoni mekkanika ġentili vigoruża u tat-tishin biex tassisti fil-hall tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tiġi ddeterminata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu. Jekk is-sustanza kimika tat-test tkun stabbli għad-durata tal-istudju, jista' jithejja alikwot tal-bidu tas-sustanza kimika, u d-dilwizzjonijiet tad-dożaġġ speċifikati jithejjew kuljum.
39. Il-puntwalità tad-dożaġġ ser tiddependi mill-mudell użat (irreferi għall-paragrafu 29 għall-mudell immatur u għall-paragrafu 30 għall-mudell adulti ovx). Il-firien nisa immaturi jingħataw doża bis-sustanza kimika tat-test kuljum għal tliet ijiem konsekuttivi. Hija rakkomandata wkoll kura ta' tliet ijiem għal firien nisa b'ovarettomija izda esponimenti itwal huma aċċettabbli u jistgħu jtejbū l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi attivi dgħajfin. Fil-ġrieden nisa b'ovarettomija, durata tal-applikazzjoni ta' 3 ijiem għandha tkun biżżejjed mingħajr vantaġġ importanti permezz ta' estensjoni li tasal sa sebat ijiem għal agonisti b'saħħithom tal-estrogen, madankollu, din ir-relazzjoni ma ntwerietx għal estrogeni dgħajfin fl-istudju ta' validazzjoni (16) u b'hekk id-dożaġġ għandu jkun estiż sa sebat ijiem konsekuttivi fi ġrieden adulti ovx. Id-doża għandha tingħata bosta drabi kuljum. Għandhom ikunu aġġustati kif ikun hemm bżonn biex jinżamm livell kostanti tad-doża f'termini ta' piż tal-ġisem tal-annimal (eż., mg tas-sustanza kimika tat-test għal kull kg ta' piż tal-ġisem kuljum). Rigward il-volum tat-test, il-varjabbiltà tiegħu, fuq bażi ta' piż tal-ġisem, għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' dożaġġ biex jiġi żgurat volum kostanti fuq bażi ta' piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża u għal kwalunkwe rotta tal-amministrazzjoni.

▼ M5

40. Meta s-sustanza kimika tat-test tinghata b'gavage, dan ghandu jsir b'doża wahda ta' kuljum lill-annimali billi jintuża tubu tal-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jinghata f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Ghandhom jiġu segwiti l-linji gwida lokali dwar l-indukrar tal-annimali, izda l-volum ma ghandux jaqbeż il-5 ml/kg piż tal-ġisem, hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża 10 ml/kg piż tal-ġisem.
41. Meta s-sustanza kimika tat-test tinghata permezz ta' tilqima taht il-ġilda, dan ghandu jsir b'doża wahda ta' kuljum. Id-dożi ghandhom jinghataw fir-reġjuni dososkapulari jew lombari permezz ta' labra sterili (eż. wisgħa ta' 23 jew 25) u siringa tuberkulina. It-tqaxxir tas-sit tat-tilqima huwa fakultattiv. Ghandhom jiġu rreġistrati kwalunkwe telf, tnixxija fis-sit tat-tilqima jew dożaġġ inkomplut. Il-volum totali injettat f'kull far f'ġurnata ma ghandux jaqbeż il-5 ml/kg piż tal-ġisem, maqsum f'2 sti tat-tilqima, hlief fil-każ ta' soluzzjoni milwiema fejn jista' jintuża 10 ml/kg piż tal-ġisem.

Osservazzjonijiet*Osservazzjonijiet generali u kliniċi*

42. Ghandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi generali tal-inqas darba kuljum u b'mod iktar spiss meta jkunu osservati sinjali ta' tossiċità. Idealment, l-osservazzjonijiet ghandhom isiru fl-istess hin(ijiet) ta' kull ġurnata u filwaqt li jitqies il-perjodu tal-ogħla effetti antiċipati wara d-dożaġġ. L-annimali kollha ghandhom jiġu osservati għall-mortalità, il-morbidità u sinjali kliniċi generali bħal bidlet fl-imġiba, il-ġilda, il-pil, l-għajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u l-attività awtonomika (eż. dmugh, piloerezzjoni, daqs tal-habba, mudell respiratorju mhux tas-soltu).

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel

43. L-annimali kollha ghandhom jintiżnu għall-egreb 0,1 g, billi jibdw f'tit qabel il-bidu tal-kura, jiġifieri meta l-annimali jiġu allokat f'gruppi. Bħala kejl fakultattiv, l-ammont ta' ikel ikkonsmat matul il-perjodu tal-kura jista' jitkejjel għal kull gaġġa billi jintiżnu dawk li jitgħalfu. Ir-riżultati tal-konsum ta' ikel ghandhom jinghataw f' grammi għal kull far kuljum.

Dissezzjoni u kejl tal-piż tal-utru

44. Erbgħa u ghoxrin siegħa wara l-aħħar kura, il-firien ser jinqatlu b'mod dinjituż. Idealment, l-ordni ta' nekropsija ser tkun aleatorja fost gruppi biex tiġi evitata progressjoni direttament 'il fuq jew 'il isfel ta' gruppi ta' doża li tista' taffettwa d-dejta b'mod li jkun diffiċli jinqabad. L-ghan tal-bijoassaġġ huwa li jitkejjel kemm il-piż tal-utru mxarrab kif ukoll dak niexef. Il-piż imxarrab jinkludu l-utru u l-kontenuti tal-fluwidu luminali. Il-piż niexef huwa mkejjel wara li jitbattlu u jitnehhew il-kontenuti luminali tal-utru.
45. Qabel id-dissezzjoni, il-vagina tiġi eżaminata għal-istatus tal-ftuħ fl-annimali immaturi. Il-proċedura ta' dissezzjoni tibda billi jinfetħ il-hajt tal-addome li jibda fis-simfiżi pubika. Imbagħad, il-qarn tal-utru u l-ovarji, jekk ikunu preżenti, jinqalgħu mill-hajt tal-addome dorsali. L-appart tal-urina u l-uretri jitnehhew min-naha ventrali u laterali tal-utru u l-vagina. Adeżjoni fibruża bejn ir-rektum u l-vagina tinqala' sakemm ikun jista' jiġi identifikat fejn jiltaqgħu l-orifiċju vaginali u l-ġilda perineali. L-utru u l-vagina jinqalgħu mill-ġisem billi ssir inċiżjoni fil-hajt vaginali f'tit 'il fuq mill-ghaqda bejn il-ġilda perineali kif muri fil-Figura 2. L-utru għandu jinqala' mill-hajt tal-ġisem permezz ta' qatgħa ġentili tal-meżenterija uterina fil-punt tat-tqabbid tagħha fit-tul shiħ tal-lat dorsolaterali ta' kull qarn uterin. Ladarba jitneħħa

▼ M5

mill-ġisem, it-tqandil tal-uterin għandu jkun rapidu biżżejjed biex tiġi evitata desikkazzjoni tat-tessuti. It-telf ta' piż minhabba desikkazzjoni jsir iktar importanti b'tessuti żgħar bhall-utru (23). Jekk l-ovarji jkunu preżenti, l-ovarji jitnehhew fil-kanal salovarju biex jiġi evitat telf ta' fluwidu luminali mill-qarn uterin. Jekk l-annimal tkun saritlu ovarettomija, il-qtajja' għandhom jiġu eżaminati għall-preżenza ta' xi tessut tal-ovarji. Xaham u tessut konnettiv żejda għandhom jinqatgħu. Il-vaġina titneħħa mill-utru f'tit taħt iċ-ċerviċi sabiex iċ-ċerviċi jibqa' mal-korp uterin kif muri fil-Figura 2.

46. Kull utru għandu jiġi ttrasferit f'kontenitur immarkat b'mod uniku u li jintiżen (eż. petri-dish jew plastic weight boat) filwaqt li jitkompla l-indukrar biex tiġi evitata desikkazzjoni qabel jintiżen (eż. karta xuga f'tit imxarrba b'salmastru tista' titqiegħed fil-kontenitur). L-utru bi fluwidu luminali ser jintiżen sal-eqreb 0,1 mg (piż tal-utru mxarrab).
47. Imbagħad kull utru jiġi pproċessat b'mod individwali biex jitneħħa l-fluwidu luminali. Iz-żewġ qrun tal-utru ser jittaqqu jew jinqatgħu b'mod longitudinali. L-utru jitqiegħed fuq karta xuga f'tit imxarrba (eż. Whatman Nru 3) u tintmesa f'tit b'biċċa oħra ta' karta xuga f'tit imxarrba biex il-fluwidu luminali jitneħħa għal kollox. L-utru mingħajr il-kontenuti luminali ser jintiżen sal-eqreb 0,1 mg (piż tal-utru niexef).
48. Il-piż tal-utru fit-tmiem jista' jintuża biex jiġi żgurat li ma nqabzix l-età xierqa fil-far intatt immatur, madankollu, id-dejta storika tar-razza tal-far użata mil-laboratorju hija deċiżiva f'dan ir-rigward (ara l-paragrafu 56 għal interpretazzjoni tar-riżultati).

Investigazzjonijiet fakultattivi

49. Wara li jintiżen, l-utru jista' jiġi ffixsat f'formalin b'bafer newtrali ta' 10 % biex jiġi eżaminat b'mod istopatoloġiku wara tilwim b'Ematossilina u Osina (HE). Il-vaġina tista' tiġi studjata kif xieraq (ara l-paragrafu 9). Barra minn hekk, il-kejl morfometrik tal-epitelju endometrijali jista' jsir għal tqabbil kwantitattiv.

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

50. Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

- in-numru ta' annimali fil-bidu tal-assaġġ,
- in-numru u l-identità tal-annimali misjubin mejtin matul l-assaġġ jew maqtulin għal raġunijiet umanitarji u d-data u l-hin ta' kwalunkwe mewta jew qatla b'mod dinjituż,
- in-numru u l-identità tal-annimali li juru sinjali ta' tossiċità, u deskrizzjoni tas-sinjali tat-tossiċità osservata, inkluż il-hin tal-bidu, id-durata, is-severità ta' kwalunkwe effett tossiku, u
- in-numru u l-identità tal-annimali li juru kwalunkwe leżjoni u deskrizzjoni tat-tip ta' leżjonijiet.

▼ M5

51. Dejta individwali dwar l-annimali għandha tiġi rreġistrata għall-piżijiet tal-ġisem, il-piż uterin imxarrab, u l-piż uterin niexef. Għandha tintuża analiżi statistika one-tailed għall-agonisti biex jiġi ddeterminat jekk l-ghoti ta' sustanza kimika tat-test irriżultatx f'żieda statistikament importanti ($p < 0,05$) fil-piż uterin. Analizzijiet statistiċi xierqa għandha ssir biex isiru testijiet għal bidliet relatati mal-kura fil-piż uterin niexef u mxarrab. Pereżempju, id-dejta tista' tiġi evalwata permezz ta' analiżi tal-approċċ ta' kovarjanza (ANCOVA) bil-piż tal-ġisem fin-nekropsija bħall-kovarjabbli. Tista' ssir trasformazzjoni logaritmika li tistabbilizza l-varjanza fuq id-dejta uterina qabel ma ssir l-analiżi tad-dejta. It-testijiet Dunnett u Hsu huma xierqa biex isir tqabbil ta' pari ta' kull grupp mogħti doża ma' kontrolli veikolu u biex jiġu kkalkolati l-intervalli ta' kunfidenza. Jistgħu jintużaw plots residwi studentizzati biex jinqabdu punti ta' osservazzjoni distanti possibbli għall-valutazzjoni tal-omoġenità tal-varjanzi. Dawn il-proċeduri ġew applikati fil-programm ta' validazzjoni tal-OECD bl-użu tal-PROC GLM fis-Sistema ta' Analizi Statistika (l-Istitut SAS, Cary, NC), verżjoni 8 (6)(7).

52. Rapport finali għandu jinkludi:

Facilità ta' ttestjar:

- Il-personal responsabbli u r-responsabilitajiet tal-istudju tiegħu,
- Dejta mit-Test Bażi ta' Kontroll Pozittiv u dejta perijodika ta' kontroll pozittiv (ara l-paragrafi 26 u 27),

Sustanza kimika tat-test:

- Il-karatterizzazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test,
- L-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-proprietajiet fiżjokimiċi,
- Il-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tad-dilwizzjonijiet,
- Kwalunkwe dejta ġġenerata fuq l-istabbiltà,
- Kwalunkwe analiżi tas-soluzzjonijiet ta' dożaġġ,

Veikolu:

- Il-karatterizzazzjoni tal-veikolu tat-test (għamla, fornitur u lott),
- Ġustifikazzjoni tal-għażla tal-veikolu (jekk mhux ilma),

Annimali tat-test:

- L-ispeċi u r-razza u ġustifikazzjoni tal-għażla tagħhom,
- Il-fornitur u l-facilità speċifika tal-fornitur,
- L-età mal-provvista bid-data tat-twelid,
- Jekk l-annimali huma immaturi, jekk ġewx forniti mal-omm jew omm adottiva u d-data tal-ftim,
- Dettalji dwar il-proċedura ta' akklimatizzazzjoni tal-annimali,
- In-numru ta' annimali għal kull gaġġa,
- Dettalji u l-metodu ta' identifikazzjoni tal-annimal individwali u tal-grupp,

Kundizzjonijiet tal-Assaġġ:

- Dettalji dwar il-proċess tal-każwalizzazzjoni (jiġifieri l-metodu uzat),
- Ir-raġuni għall-għażla tad-doża,

▼ **M5**

- Dettalji dwar il-fomulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, il-koncentrazzjonijiet, l-istabbiltà u l-omoġenità tagħha,
- Dettalji tal-ġhoti tas-sustanza kimika tat-test u r-raġuni għall-ghażla tar-rotta ta' esponiment,
- Id-dieta (isem, tip, fornitur, kontenut, u, jekk ikunu magħrufin, il-livelli tal-fitoestrogen),
- Is-sors ta' ilma (eż., ilma tal-vit jew ilma ffiltrat) u l-provvista tal-ilma (b'tubi minn kontenitur kbir, fi flieken, eċċ.),
- Il-bejta (l-isem, it-tip, il-fornitur, il-kontenut),
- Reġistru tal-kundizzjonijiet tal-gaġġa, l-intervall tad-dawl, it-temperatura u l-umdità fil-kamra, it-tindif tal-kamra,
- Deskrizzjoni dettaljata tan-nekropsija u tal-proċeduri ta' wżin tal-utri
- Deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi,

*Riżultati**Għal annimali individwali:*

- Il-pizijiet tal-gisem individwali kollha ta' kuljum (mill-allokazzjoni fi gruppi san-nekropsija) (sal-eqreb 0,1 g),
- L-età ta' kull annimal (fil-jiem li jibdw mill-jum tat-twelid bħala l-jum 0) meta jibda l-ġhoti tas-sustanza kimika tat-test,
- Id-data u l-hin ta' kull ġhoti ta' doża,
- Il-volum u d-dożaġġ ikkalkolati mogħtijin u l-osservazzjonijiet ta' kwalunkwe telf ta' dożaġġ matul jew wara l-ġhoti,
- Reġistru ta' kuljum tal-qagħda tal-annimal, inklużi sintomi u osservazzjonijiet rilevanti,
- Il-kawża tal-mewt issuspettata (jekk tinsab matul studju fi stat moribond jew mejjet),
- Id-data u l-hin tal-qti b'mod dinjituż b'intervall tal-hin għall-aħħar dożaġġ,
- Il-piż uterin imxarrab (sal-eqreb 0,1 mg) u kwalunkwe osservazzjoni ta' telf ta' fluwidu luminali matul id-dissezzjoni u l-preparazzjoni biex jintiżen,
- Piż uterin niexef (sal-eqreb 0,1 mg),

Għal kull grupp ta' annimali:

- Il-pizijiet medji tal-gisem ta' kuljum (sal-eqreb 0,1 g) u devjazzjonijiet standard (minn allokazzjoni fi gruppi permezz ta' nekropsija),
- Medji tal-pizijiet uterini mxarrbin u nixfin (sal-eqreb 0,1 mg) u devjazzjonijiet standard,
- Jekk jitkejjel, il-konsum ta' ikel ta' kuljum (ikkalkolat bħala grammi ta' ikel ikkonsumat għal kull annimal),

▼ **M5**

- Ir-riżultati tal-analizzijiet statistiċi li jqabblu kemm piżijiet uterini mxarrbin kif ukoll nixfin ta' gruppi kkurati fir-rigward tal-istess kejljet fil-gruppi ta' kontroll veikoli,
- Ir-riżultati tal-analizi statistika li tqabbel il-piż shih tal-gisem u ż-żieda fil-piż tal-gisem tal-gruppi kkurati relatati mal-istess kejljet fil-gruppi ta' kontroll veikoli.

53. Sommarju tal-fatti importanti ta' gwida tal-metodu ta' ttestjar

	Firien	Ġrieden
Annimali		
Razza	Razza ta' roditori tal-laboratorju użata spiss	
Numru ta' annimali	Tal-inqas 6 annimali għal kull grupp ta' doża	
Numru ta' gruppi	Tal-inqas 2 gruppi tat-test (ara l-paragrafu 33 għal gwida) u grupp ta' kontroll negattiv Għal gwida dwar gruppi ta' kontroll pożittiv, ara l-paragrafi 26 u 27	
Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-ghalf		
T° fil-kamra tal-annimali	22°C ± 3°C	
Umdità relativa	50-60 % u mhux inqas minn 30 % jew iktar minn 70 %	
Sekwenza tad-dawl ta' kuljum	12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam	
Dieta u ilma tajjeb għax-xorb	Ad libitum	
Post tat-trobbija	B'mod individwali jew fi gruppi sa tliet annimali (trobbija fi grupp soċjali hija rakkomandata għal annimali immaturi)	
Dieta u bejta	Livell baxx ta' fitoestrogeni rakkomandati fid-dieta u l-bejta	
Protokoll		
Metodu	Metodu immatur minghajr ovar-jettomija (dak preferut). Metodu ta' firien nisa adulti b'ovarettomija	Metodu ta' ġrieden nisa adulti b'ovarettomija
L-età tad-dożaġġ għal annimali immaturi	Mhux qabel PND 18. Id-dożaġġ għandu jsir qabel PND 25	Mhux rilevanti fil-kamp ta' applikazzjoni tal-metodu ta' ttestjar attwali.
Età tal-ovarettomija	Età ta' bejn 6 u 8 ġimghat.	
Età tad-dożaġġ għal annimali b'ovarettomija	Għandhom ikunu għaddew tal-inqas 14-il jum bejn l-ovarettomija u l-1 jum ta' ghoti.	Għandhom ikunu għaddew tal-inqas 7 ijiem bejn l-ovarettomija u l-1 jum ta' ghoti.
Piż tal-ġisem	Il-varjazzjoni fil-piż tal-ġisem għandha tkun minima u ma taqbiżx ± 20 % tal-piż medju.	

▼ M5

	Firien	Ġrieden
Dożaġġ		
Rotta tal-amministrazzjoni	Gavage orali jew tilqima taht il-ġilda	
Frekwenza tal-ġhoti	Doża wahda kuljum	
Ammont ta' volum ghal gavage u tilqima	≤ 5 ml/kg piż tal-ġisem (jew sa 10 ml/kg piż tal-ġisem f'każ ta' soluzzjonijiet milwiema) (f2 siti ta' tilqim ghar-rotta taht il-ġilda)	
Durata tal-ġhoti	3 ijiem konsekuttivi għall-mudell immatur Tal-inqas 3 ijiem konsekuttivi għall-mudell OVX	7 ijiem konsekuttivi għall-mudell OVX
Hin tan-nekropsija	Madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża	
Riżultati		
Rispons pożittiv	Żieda statistikament sinifikanti tal-piż medju tal-utru (imxarrab u/ jew niexef)	
Estroġen ta' referenza	17α-etinil estradjol	

GWIDA GĦALL-INTERPRETAZZJONI U L-AĊĊETTAZZJONI TAR-RIŻULTATI

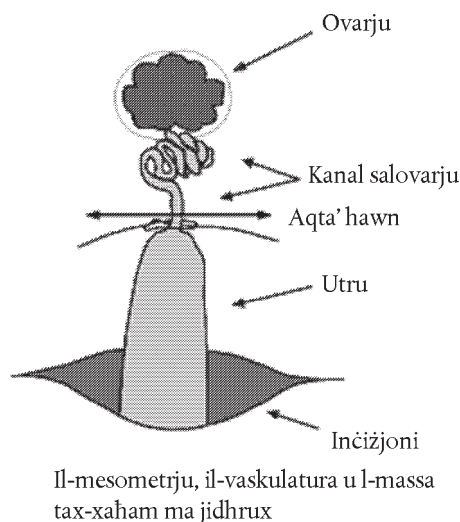
54. B'mod ġenerali, test għall-estrogeniċità għandu jitqies pożittiv jekk ikun hemm zieda statistikament importanti fil-piż tal-utru ($p < 0,05$) tal-inqas fil-livell għoli tad-doża meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll b'solvent. Riżultat pożittiv huwa appoġġjat iktar mill-wiri ta' relazzjoni bijologikament plawżibbli bejn id-doża u d-daqs tar-rispons, filwaqt li jifakkar li attivitajiet estrogeniċi u antiestrogeniċi tas-sustanza kimika li jidhlu f'xulxin jistgħu jaffettwaw il-forma tal-kurva bejn id-doża u r-rispons.
55. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma tinqabizx id-doża massima tollerata halli tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Tnaqqis fil-piż tal-ġisem, sinjali kliniċi u sejbiet oħrajn għandhom jiġu vvalutati fid-dettall f'dan ir-rigward.
56. Kunsiderazzjoni importanti għall-aċċettazzjoni tad-dejta mill-Bijoassaggi Uterotrofik hi li l-piżijiet tal-utru tal-grupp ta' kontroll veikolu. Valuri ta' kontroll għoljin jistgħu jikkompromettu r-risponsività tal-bijoassaggi u l-hila li jiġu identifikati agonisti tal-estroġen ferm dgħajfin. Analizzjiet tat-tagħrif u d-dejta ġġenerata matul il-validazzjoni tal-Bijoassaggi Uterotrofik jissuggerixxu li waqtiet ta' medji ta' kontroll għoljin isehhu b'mod spontanju, b'mod partikolari f'annimali immaturi (2)(3)(6)(9). Peress li l-piż tal-utru ta' firien immaturi jiddependi fuq bosta varjabbli bħar-razza u l-piż tal-ġisem, ma jista' jingħata ebda limitu superjuri definittiv għall-piż tal-utru. Bħala gwida, jekk il-piżijiet tal-utru niexef f'firien ta' kontroll immaturi jkunu ta' bejn 40 u 45 mg, ir-riżultati għandhom jitqiesu bħala suspettużi u piżijiet tal-utru ta' iktar minn 45 mg jistgħu jwasslu sabiex it-test jerga' jsir. Madankollu, dan irid jitqies fuq bażi ta' każ b'każ (3)(6)(8). Meta jsiru testijiet f'firien adulti, ovariettomija inkompluta ser thalli tessuti tal-ovarji li jista' jipproduċi estrogeni endoġenu u jittardja r-rigressjoni tal-piż tal-utru.

▼ M5

57. Pizijiet tal-utru niexef tal-kontroll veikolu li huma inqas minn 0,09 % tal-piż tal-giesm ghal firien nisa immaturi u inqas minn 0,04 % ghal firien nisa zghazagh b'ovarettomija jidhru li jrendu rizzultati aċċettabbli (ara t-Tabella 31 (2)). Jekk il-pizijiet tal-utru tal-kontroll ikunu ikbar minn dawn in-numru, għandhom jiġu skrutinizzati bosta fatturi inklużi l-età tal-annimali, ovarettomija xierqa, fitoestrogeni djetetiċi, u l-bqija, u rizzultat ta' assaġġ negattiv (ebda indikazzjoni ta' attività estrogenika) għandu jintuza bir-reqqa.
58. Dejta storika għall-gruppi ta' kontroll veikolu għandha tinżamm fil-laboratorju. Dejta storika għal risponsi għal estrogeni ta' referenza pożittivi, bħal 17 α -etinil estradijoli, għandha tinżamm fil-laboratorju wkoll. Il-laboratorji jistgħu jittestjaw ukoll ir-rispons għal agonisti tal-estrogeni dgħajfin li jkunu magħrufi. Din id-dejta kollha tista' titqabbel mad-dejta disponibbli (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) biex jiġi żgurat li l-metodi tal-laboratorju jrendu bizżejjed sensitività.
59. Il-pizijiet tal-utru niexef urew inqas varjabbiltà matul l-istudju ta' validazzjoni tal-OECD meta mqablin mal-pizijiet tal-utru mxarrab (6)(7). Madankollu, rispons importanti fxi kejl jindika li s-sustanza kimika tat-test hija pożittiva għal attività estrogenika.
60. Ir-rispons uterotrofik mhuwiex kompletament ta' oriġini estrogenika, madankollu, rizzultat pożittiv tal-Bijoassaġġ Uterotrofik għandu ġeneralment jiġi interpretat bħala evidenza għal potenzjal estrogeniku in vivo, u normalment għandu jniedi azzjonijiet għal klassifikazzjoni ulterjuri (ara l-paragrafu 9 u l-'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals', Anness 2).

Figura 1

Dijagramma skematika turi t-thennija kirurġika tal-ovarji



Il-proċedura tibda billi jinfetħ il-hajt tal-addome dorsolaterali fil-punt tan-nofs bejn il-limitu inferjuri kostali u l-qoxra iljaka, u f'it millimetri laterali għall-marġni laterali tal-muskolu lombari. Fi hdan il-kavità tal-addome, għandhom jiġu identifikati l-ovarji. Fuq pjan asettiku, imbagħad l-ovarji jitnehhew fizikament mill-kavità tal-addome, titqiegħed ligatura bejn l-ovarju u l-utru biex jiġi kkontrollat il-fsad, u l-ovarju jinqala' permezz ta' inċiżjoni fuq il-ligatura fl-għaqda tal-kanal salovarju u kull qarn tal-utru. Wara l-konferma li ebda fsad importanti ma għadu jippersisti, il-hajt tal-addome għandu jingħalaq b'sutura, u tingħalaq il-ġilda, eż., b'autoclips jew sutura. L-annimali għandhom jithallew jirkupraw u l-piż tal-utru għandu jithalla jagħmel rigress għal tal-inqas 14-il jum wara l-użu.

It-tnehhija u l-preparazzjoni tat-tessuti tal-utru għall-kejl tal-piż



Il-proċedura tibda billi jinfetħa il-ħajt tal-addome fis-simfizi pubika. Imbagħad, kull ovarju, jekk ikun preżenti, u l-qarn tal-utru jitnehhew mill-ħajt tal-addome dorsali. L-apparat tal-urina u l-uretri jitnehhew mill-lat ventrali u laterali tal-utru u l-vagina. L-ađeżjoni fibruża bejn ir-rektum u l-vagina jinqalghu sakemm l-għaqda tal-orifiċju vaginali u l-gilda perineali jkunu jistgħu jiġu identifikati. L-utru u l-vagina jinqalghu mill-gisem permezz ta' incizjoni tal-ħajt vaginali f'tit 'il fuq mill-għaqda bejn il-gilda perineali kif muri fil-figura. L-utru għandu jinqala' mill-ħajt tal-gisem billi ssir qatgħa ħafifa tal-mezenterija uterina fil-punt ma' fejn taqbad matul it-tul shih tal-aspett dorsolaterali ta' kull qarn uterin. Wara t-nehhija mill-gisem, ix-xaham zejjed u t-tessut konnettiv jinqata'. Jekk ikunu preżenti l-ovarji, l-ovarji jitnehhew fil-kanal salovarju biex jiġi evitat telf ta' fluwidu luminali mill-qarn uterin. Jekk l-animall tkun saritlu ovarettomija, il-qtajja' għandhom jiġu eżaminati għal-preżenza ta' xi tessut tal-ovarji. Il-vagina titneħħa mill-utru eżatt taħt iċ-ċerviċi sabiex iċ-ċerviċi jibqgħa' mal-korp uterin kif muri fil-figura. Imbagħad l-utru jista' jintiżen.

▼ **M5***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET:**

Antiestroġenicità hija l-kapaċità ta' sustanza kimika sabiex trażżan l-azzjoni tal-estradjol 17β f'organizmu mammiferu.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

Data tat-twelid hija l-jum 0 wara t-twelid.

Dożaġġ hija terminu ġenerali li tinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Doża hija l-ammont ta' sustanza kimika mogħtija. Għall-Bijoassaġġ Uterotrofiku, id-doża tingħata bħala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull piż tal-ġisem ta' unità tal-annimal tat-test f'kull jum (eż. mg/kg piż tal-ġisem/jum).

Doża Massima Tollerabbli (MTD) hija l-ogħla ammont ta' sustanza kimika li, meta tiddaħhal fil-ġisem, ma toqtolx lill-annimali tat-test (denotata b'LD₀) (IUPAC, 1993).

Estroġenicità hija l-kapaċità li sustanza kimika tagħxi bħal estradjol 17β f'organizmu mammiferu.

Jum X wara t-twelid huwa l-jum numru X tal-hajja wara t-twelid.

Sensitività hija l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar.

Speċifikità hija l-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Uterotrofika hija terminu użata biex tigi deskritta influwenza pożittiva fuq it-tkabbir tat-tessuti tal-utru.

Validazzjoni hija proċess xjentifiku mfassal sabiex jikkarakterizza r-rekwiżiti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex juri l-affidabilità u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

Appendiċi 2

Nota: Dokument inhejjimis Segretarjat tal-Programmi tal-Lingji Gwida ghat-T estijiet abbaži tal-ftehim milhuq fit-Sitt Laqgħa tat-TaskForce tal-EDTA

Il-Qafas Kuncettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixklu s-Sistema Endokrinali

Livell 1 Għażla u prijoritizzazzjoni abbaži ta' informazzjoni eżistenti	— karatteristiċi fiżiċi u kimiċi, eż., MW, reattività, volatilità, bijodegradabilità, — esponim ent uman u ambjentali eż. Volum tal-produzzjoni, rilaxx, mudelli tal-użu — periklu, eż. Deġta tossikoloġika disponibbli
Livell 2 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġta mekkanistika	— ER, AR, TR affinità tar-riċettur li torbot — Aktivazzjoni transkrizzjonali — Aromatażi u sterojdoġenesi <i>in vitro</i> — Aċċettazzjoni mir-riettur tal-aril idrokarbonjuorbot — QSARs — High Through Put Prescreens — Funzjoni ta t-tirojde — Assaġġ VTG epatoċite fil-hut — Ohrajn (skontil-każ)
Livell 3 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġta dwar mekkanizmi u effetti endokrinali uniċi	— Assaġġi uterotrofik (relatat mal-estrogeniku) — Assaġġi Hershberger (relatat mal-androgeniku) — Funzjoni tal-ormon mhux medjat mir-riċe vitur — Ohrajn (eż. it-tirojde) — Assaġġ VTG (vitellogenin) fil-hut (relatat mal-estrogeniku)
Livell 4 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġta dwar mekkanizmi u effetti endokrinali multipli	— OECD 407 imsahhah (il-punti ahharin abbaži ta' mekkanizmi endokrinali) — assaġġi fuq l-irġiel u n-nisa fil-pubertà — assaġġi fuq raġel adult intatt — Assaġġ tal-is topatoloġija gonadali fil-hut — Assaġġ tal-metamorfozi taż-żring
Livell 5 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġta dwar l-effetti mil- mekkanizmi endokrinali u ohrajn	— assaġġi ġenerazzjoni-1 (imsahhah bit-TG415)¹ — assaġġi ġenerazzjoni-2 (imsahhah bit-TG416)¹ — test ta' tgharbil riproduttiv (imsahhah bit-TG421)¹ — test ikkumbinat ta' 28 jum/tgharbil riproduttiv (imsahhah bit-TG 422)¹ — Assaġġi taċ-ċiklu tal-hajja parzjali u dak shih fil-hut, l-ghasafar, l-amfibji, u l-invertebrati (tal-iżvilupp u r-riproduzzjoni) ¹ Iktar tishih potenzjali kkunsidrat permer ta' VMG

VMG mamm: Grupp ta' Mmanigġjar tal-Validazzjoni fuq Ittestjar u Valutazzjoni tal-Mammiferi

▼ **M5**

NOTI GHALL-QAFAS

- Nota 1:* Dhul fil-livelli kollha u ħruġ fil-livelli kollha huma possibbli u jiddependu fuq l-ghamla tal-htigijiet eżistenti ta' informazzjoni għal skopijiet ta' valutazzjoni tal-periklu u r-riskju
- Nota 2:* Fil-livell 5, l-ekotossikoloġija għandha tinkludi punti aħharin li jindikaw mekkanizmi ta' effetti avversi, u l-ħsara potenzjali għall-popolazzjoni
- Nota 3:* Meta mudell multimodali jkopri diversi mill-assaġġi tal-punt aħhari uniku, dak il-mudell jiehu post l-użu ta' dawk l-assaġġi tal-punt aħhari uniku
- Nota 4:* Il-valutazzjoni ta' kull sustanza kimika għandha tkun imsejsa fuq bażi ta' każ b'każ, filwaqt li tittiehed f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni, filwaqt li tibqa' mfakkra l-funzjoni tal-livelli tal-qafas.
- Nota 5:* Il-qafas ma għandux jitqies li jinkludi kolloxx bħalissa. Fil-livelli 3, 4 u 5 jinkludi assaġġi li jew huma disponibbli jew inkella li għalihom qed issir validazzjoni. Fir-rigward ta' dawn tal-aħhar, dawn huma inkluzi b'mod provvizorju. Ladarba jiġu żviluppati u vvalidati, dawn ser jiżdiedu b'mod formali mal-qafas.
- Nota 6:* Il-livell 5 ma għandux jitqies li jinkludi testijiet definittivi biss. It-testijiet inkluzi f'dak il-livell jitqiesu li jikkontribwixxu għall-valutazzjoni generali tal-periklu u r-riskji.

▼M5

TAGHRIF

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 ta' Marzu 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.
- (11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.
- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369–373.

▼M5

- (16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145–157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613–620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477–485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343–347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381–393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596–601.
- (24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (25) 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.
- (26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320–333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33–41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288–305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284–291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Parigi.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401–416.

▼ **M5**

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1–2): 159–184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM u Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807–1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410–1414.
- (37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- (38) 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 (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).

▼ M5

B.55. BIJOASSAĠĠ HERSHBERGER F'FIRIEN: ASSAĠĠ TA' TGHARBIL TA' TERMINU QASIR GHAL PROPRJETAJIET (ANTI)ANDROĠENIĠI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti ghal-Linja Gwida tat-Test (TG) tal-OECD Nru 441 (2009). L-OECD nediet attività ta' prijorità għolja fl-1998 biex tirrevedi l-linji gwida eżistenti u tiżviluppa linji gwida ġodda għat-tgharbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali (1). Element minnhom tal-attività kien li tiżviluppa linja gwida tat-test għall-Bijoassaġġ Hershberger tal-firien. Wara għexieren ta' snin ta' użu mill-industrija farmaċewtika, dan l-assaġġ ġie standardizzat għall-ewwel darba minn kumitat uffiċjali tal-esperti fl-1962 bħala għodda tat-tgharbil għal sustanzi kimiċi androġeniċi (2). Fl-2001-2007, il-Bijoassaġġ Hershberger tal-firien sarlu programm ta' validazzjoni estensiv inkluża l-ġenerazzjoni ta' Dokument ta' Revizjoni ta' Sfond (23), kompilazzjoni ta' dokument tal-metodi dettaljati (3), l-iżvilupp ta' gwida dwar id-dissezzjoni (21) u t-tweqqif ta' studji intra u interlaboratorji estensivi biex jintwerew l-affidabilità u r-riproducibilità tal-bijoassaġġ. Dawn l-istudji ta' validazzjoni saru b'androġen ta' referenza qawwi (testosteron propjonat (TP)), żewġ androġeni sintetiċi qawwjin (trenbolon aċetat u metil testosteron), farmaċewtiku antiandroġeniku qawwi (flutamid), inibitur qawwi tas-sintezi (finasterid) tal-androġen naturali (diidrotestosteron-DHT), bosta pesticidi antiandroġeniċi dgħajfin (linuron, vinklozolina, proċimidon, p,p' DDE), inibitur qawwi ta' 5 α ridottasi (finasterid) u żewġ sustanzi kimiċi negattivi magħrufin (dinitrofenol u nonilfenol) (4)(5)(6)(7)(8). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-riżultat tal-esperjenza storika twila bil-bijoassaġġ u l-esperjenza miksuba matul il-programm tat-test ta' validazzjoni u r-riżultati miksubin bih.

2. Il-Bijoassaġġ Hershberger huwa test ta' tgharbil *in vivo* ta' terminu qasir li juża tessuti aċċessorji tal-apparat riproduttiv tal-irġiel. L-assaġġ oriġina fis-snin tletin u ġie modifikat fis-snin erbgħin biex jinkludi muskoli riżponsivi għall-androġen fl-apparat riproduttiv tal-irġiel (2) (9-15). Fis-snin sittin, ġew evalwati iktar minn 700 androġen possibbli billi ntuzat verżjoni standardizzata tal-protokoll (2)(14), u l-użu tal-assaġġ kemm għal androġeni kif ukoll għal antiandroġeni tqies li huwa metodu standard fis-snin sittin (2)(15). Il-bijoassaġġ kurrenti huwa bbażat fuq il-bidliet fil-piż ta' hames tessuti li jiddependi fuq l-androġen fil-far raġel peripubertali msewwi. Jevalwa l-hila ta' sustanza kimika li tniedi attivitajiet bijoloġiċi konsistenti mal-agonisti androġeni, antagonisti jew inibituri ta' 5 α -ridottasi. Il-hames tessuti fil-mira li jiddependu fuq l-androġen inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar huma l-prostata ventrali (VP), in-nuffata seminali (SV) (kif ukoll fluwidi u glandoli koagulant), il-muskolu reffiegh ani-bulbokavernosu (LABC), il-glandoli ta' Cowper flimkien (COW) u r-ras tal-pene (GP). Fil-far raġel peripubertali msewwi, dawn il-hames tessuti kollha kemm huma jwieġbu għal androġeni b'żieda fil-piż assolut. Meta dawn l-istess tessuti jiġu stimolati biex jiżdiedu fil-piż permezz tal-ġhoti ta' androġen ta' referenza qawwi, dawn il-hames tessuti kollha jwieġbu għall-antiandroġeni bi tnaqqis fil-piż assolut. Il-mudell primarju għall-bijoassaġġ Hershberger kien ir-raġel peripubertali msewwi b'kirurġija, li ġie validat fil-Fażijiet 1, 2 u 3 tal-programm ta' validazzjoni ta' Hershberger.

3. Il-Bijoassaġġ Hershberger iservi bħala assaġġ mekkanistiku ta' tgharbil *in vivo* għal agonisti tal-androġen, antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5 α -ridottasi u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuontest tal-“Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixxlu

▼ M5

s-Sistema Endokrinali” (Appendiċi 2). F'dan il-Qafas Kuncettwali, il-Bijoassagġ Hershberger jinsab fil-Livell 3 bhala assaġġ *in vivo* li jipprovi dejta dwar mekkanizmu endokrinali wiehed, jiġifieri (anti)androgeniċità. Huwa mahsub sabiex ikun inkluż f'serje ta' testijiet *in vitro* u *in vivo* biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi b'potenzjal li jinteraġixxu mas-sistema endokrinali, li finalment iwasslu għal valutazzjonijiet tal-periklu u r-riskju għas-saħħa tal-bniedem jew l-ambjent.

4. Minhabba thassib relatat mal-benessri tal-annimali fil-proċedura ta' tiswija, intuża r-raġel intatt stimolat (mhux imsewwi) li jkun għadu kif infatam bhala mudell alternattiv għall-Bijoassagġ Hershberger biex jiġi evitat il-pass tat-tiswija. Il-metodu tat-test tar-raġel stimolat li jkun għadu kif infatam ġie validat (24); madankollu, fl-istudji ta' validazzjoni, il-verżjoni tar-raġel li jkun għadu kif infatam tal-Bijoassagġ Hershberger ma dehritx li kapaċi tidentifika effetti b'mod konsistenti fuq piżijiet tal-organi li jiddependu fuq androġen minn antiandroġeni dghajfin bid-dożi ttestjati. Għalhekk, ma kienx inkluż f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, peress li l-użu tiegħu jista' jipprovi mhux biss benefiċċji għall-benessri tal-annimali iżda jista' jipprovi wkoll informazzjoni dwar modi oħrajn ta' azzjoni, huwa disponibbli fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 115(25).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

5. L-agonisti u l-antagonisti tal-androġen jaġixxu bhala lega għar-riċettur tal-androġen u jistgħu jattivaw jew jinibixxu, rispettivament, it-traskrizzjoni tal-ġeni kkontrollata mir-riċettur. Barra minn hekk, ċerti sustanzi kimiċi jinibixxu l-konverżjoni ta' testosterone għall-androġenu naturali iktar qawwi diidrotestosterone f'xi tessuti tal-androġen fil-mira (inibituri ta' 5 α -ridottasi). It-tali sustanzi kimiċi għandhom il-potenzjal li jwasslu għal perikli avversi għas-saħħa, inklużi effetti fuq ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp. Għalhekk, hemm bżonn regolatorju biex sustanza kimika tiġi vvalutata u evalwata malajr bhala agonist jew antagonist possibbli tal-androġen jew inibitur ta' 5 α -ridottasi. Filwaqt li informattiva, l-affinità tal-lega għal riċettur tal-androġen kif imkejla permezz tar-rabta tar-riċettur jew l-attivazzjoni transkrizzjonali tal-ġeni rapportaturi *in vitro* mhijiex l-uniku determinant ta' periklu possibbli. Determinanti oħrajn jinkludu attivazzjoni u diżattivazzjoni metaboliċi malli jidhlu fil-ġisem, distribuzzjoni kimika biex jimmiraw għal tessuti, u tnehhija mill-ġisem. Dan iwassal għall-bżonn li titgħarbel l-attività possibbli ta' sustanza kimika *in vivo* f'kundizzjonijiet u esponiment rilevanti. L-evalwazzjoni *in vivo* hija inqas kritika jekk ikunu magħrufin il-karatteristiċi tas-sustanza kimika rigward Assorbiment — Distribuzzjoni — Metabolizmu — Eliminazzjoni (ADME). Tessuti li jiddependu fuq androġen iwieġbu bi tkabbir rapidu u qawwi għall-istimolu minn androġeni, b'mod partikolari f'frien irġiel peripubertali msewwijin. Speċi roditori, b'mod partikolari l-far, jintużaw spiss ukoll fl-istudji dwar it-tossiċità għall-karatterizzazzjoni tal-perikli. B'hekk, il-verżjoni l-assaġġ, li tuża l-far peripubertali msewwi u l-hames tessuti fil-mira f'dan l-assaġġ, hija xierqa għat-tgħarbil *in vivo* ta' agonisti u antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5 α -ridottasi.
6. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq dawk il-protokolli mhaddmin fl-istudju ta' validazzjoni tal-OECD li ntweru li huma affidabbli u riproduttibbli fi studji intra u interlaboratorji (4)(5)(6)(7)(8). Kemm il-proċeduri androġeni kif ukoll dawk antiandroġeni huma ppreżentati f'dan il-metodu ta' ttestjar.
7. Għad li kien hemm xi varjazzjoni fid-doża tat-TP użata biex jiġu identifikati antiandroġeni fil-programm tal-OECD ta' validazzjoni tal-Bijoassagġ mil-laboratorji differenti (0,2 versus 0,4 mg/kg/d, tilqima taht il-ġilda), ftit li xejn kien hemm differenza bejn dawn iż-żewġ varjazzjonijiet fil-protokoll fil-hila biex jaqdbu attività antiandroġenika dghajfa jew qawwija. Madankollu, huwa ċar li d-doża tat-TP ma għandhiex tkun għolja wisq tant li timblokka l-effetti ta' antagonisti dghajfin tar-riċettur tal-androġenu (AR) jew baxxa wisq tant li t-tessuti androġeniċi juru rispons tat-tkabbir batut anki mingħajr il-koamministrazzjoni tal-antiandroġen.

▼ M5

8. Ir-rispons tat-tkabbir tat-tessuti individwali li jiddependu fuq l-androġen mhuwiex ta' oriġini kompletament androġenika, jiġifieri sustanzi kimiċi minbarra agonisti androġeni li jibdli l-piż ta' ċerti tessuti. Madankollu, ir-rispons għat-tkabbir ta' bosta tessuti fl-istess hin isostni mekkaniżmu iktar speċifiku għall-androġen. Pereżempju, dożi għoljin ta' estroġeni qawwijin jistgħu jzidu l-piż tal-infafet seminali; madankollu, it-tessuti l-oħrajn li jiddependu fuq l-androġen fl-assaġġ ma jwiegħbux b'mod simili. Is-sustanzi kimiċi antiandroġeniċi jistgħu jaġixxu jew bhala antagonisti tar-riċetturi androġeni jew inibituri ta' 5 α -ridottasi. L-inibituri ta' 5 α -ridottasi għandhom effett varjabbli, għaliex il-konverżjoni għal diidrotestosteron iktar qawwi tvarja skont it-tessut. L-antiandroġeni li jinibixxu 5 α — ridottasi, bħal finasterid, għandhom effetti li jinhassu iktar fil-prostata ventrali minn tessuti oħrajn meta mqabblin ma' antagonist AR qawwi, bħal flutamid. Din id-differenza fir-rispons tat-tessut tista' tintuża biex tinhareġ differenza bejn modi ta' azzjoni medjati b'AR u dawk medjati b'5 α — ridottasi. Barra minn hekk, ir-riċettur tal-androġen huwa relatat fil-livell tal-evoluzzjoni ma' dak ta' ormoni tal-isteroidi oħrajn, u xi ormoni oħrajn, meta jingħata b'livelli ta' dożaġġ għoljin suprafizjoloġiċi, jista' jwagħhal u jantagonizza l-effetti tat-TP li jippromwovu t-tkabbir (13). Barra minn hekk, huwa plaw-zibbli wkoll li metabolizmu msahħah tal-isteroidi u t-tnaqqis konsegwenti tat-testosteron tas-serum jistgħu jnaqqsu t-tkabbir tat-tessuti li jiddependu fuq l-androġen. Għalhekk, kwalunkwe eżitu pożittiv fil-Bijoassaġġ Hershberger normalment għandu jiġi evalwat billi jintuża approċċ ta' piż tal-evidenza, inklużi assaġġi *in vitro*, bħall-assaġġi vinkolanti tal-AR u tar-riċetturi tal-estroġen (ER) u l-assaġġi ta' attivazzjoni transkrizzjonali korrispondenti, jew minn assaġġi *in vivo* oħrajn li jeżaminaw tessuti simili tal-androġen fil-mira bħall-assaġġ pubertali tal-irġiel, l-assaġġ tal-irġiel adulti intatti ta' 15-il jum, jew studji ta' doża ripetuta ta' 28 jum jew 90 jum.
9. L-esperjenza tindika li androġeni ksenobijotiċi huma iktar rari minn antian-droġeni ksenobijotiċi. Allura huwa mistenni li l-bijoassaġġ Hershberger ser jintuża spiss għat-tgħarbil ta' antianandroġeni. Madankollu, il-proċedura għall-ittestjar għal androġeni xorta waħda tista' tkun rakkomandata għal sustanzi kimiċi sterojđali jew simili għall-isteroidi jew għal sustanzi kimiċi li għalihom indikazzjoni tal-effetti androġeniċi possibbli nġiebet minn metodi li jnsabu fil-Livell 1 jew 2 tal-qafas kunċettwali (Appendiċi 2). B'mod simili, effetti avversi assoċjati ma' profili (anti)androġeniċi jistgħu jkunu osservati fl-assaġġi tal-Livell 5, li jwasslu għall-bżonn li jiġi vvalutat jekk sustanza kimika toperax permezz ta' mod ta' azzjoni endokrinali.
10. Huwa rikonoxxut li l-proċeduri kollha bbazati fuq l-annimali għandhom ikunu konformi mal-istandards lokali tal-indukrar tal-annimali; id-deskrizzjonijiet tal-indukrar u l-kura stabbiliti hawn taht huma standards minimi tal-prestazzjoni, u ser jiġu sostitwiti minn regolamenti lokali bħad-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 (26). Iktar għida dwar it-trattament umanitarju tal-annimali tingħata mill-OECD (17).
11. Bħal fi kwalunkwe bijoassaġġ li juża annimali sperimentali, għandha tingħata kunsiderazzjoni attenta għall-htieġa li jitwettaq dan l-istudju. Bazi-kament, jista' jkun hemm zewġ raġunijiet għal deċiżjoni bħal din:
 - potenzjal ta' esponiment għoli (Livell 1 tal-Qafas Kunċettwali) jew indi-kazzjonijiet għal (anti)androġeniċità f'assaġġi *in vitro* (Livell 2) li jappoġġjaw investigazzjonijiet dwar jekk it-tali effetti jistgħux isehħu *in vivo*,
 - effetti konsistenti ma' (anti)androġeniċità f'testijiet *in vivo* tal-Livell 4 jew 5 li jsostnu investigazzjonijiet tal-mod ta' azzjoni speċifiku, eż., biex jiġi determinat jekk l-effetti kinux dovuti għal mekkaniżmu (anti)andro-ġeniku.

▼ M5

12. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

13. Il-Bijoassagġ Hershberger jikseb is-sensittività tiegħu billi juża rġiel bi produzzjoni minima ta' androġen endoġenu. Dan jinkiseb permezz tal-użu ta' rġiel imsewwijin diment li jingħata biżżejjed żmien wara t-tiswija biex jiġu mmirati tessuti għar-rigress lejn piż bażi minimu u uniformi. B'hekk, meta jsir tgħarbil tal-attività androġenika potenzjali, hemm livelli endoġenu baxxi ta' androġeni ċirkolanti, l-assi ipotalamiku — pitwitarju — gonadi ma jibqax kapaċi jikkumpensa permezz ta' mekkanizmi ta' tagħlif, il-hila tat-tessuti biex iwiegħu tkun massimizzata, u l-varjabbiltà tal-piż tat-tessut tal-bidu tiġi minimizzata. Meta jsir tgħarbil ta' attività antiandroġenika potenzjali, tista' tinkiseb zieda iktar konsistenti fil-piż tat-tessut meta t-tessuti jkunu stimolati permezz ta' androġen ta' referenza. B'hekk, il-Bijoassagġ Hershberger jehtiegħ biss 6 annimali għal kull grupp tad-doża filwaqt li assi oħrajn bi rġiel pubertali jew adulti intatti jissuġġerixxu li jintużaw 15-il raġel f'kull grupp ta' doża.
14. It-tiswija ta' frien irġiel peripubertali għandha ssir b'mod xieraq billi jintużaw anestetici u teknika aseptika approvati. L-analgeziċi għandhom jingħataw fl-ewwel ftit jiem wara l-kirurġija biex tiġi eliminata skumdità ta' wara l-kirurġija. It-tiswija ssahħaħ il-preċiżjoni tal-assaġġ biex jinqabdu androġeni u antiandroġeni batuti billi telimina mekkanizmi kompensatorji endokrinali ta' rispons preżenti fl-annimal intatt li jistgħu jtaffu l-effetti tal-androġeni u l-antiandroġeni mogħtijin u billi tiġi eliminata l-varjabbiltà kbira bejn l-individwi fl-livelli tat-testosteron tas-serum. B'hekk, it-tiswija tnaqqas in-numri ta' annimali mehtieġa li jitgħarblu għal dawn l-attivitàjiet endokrinali.
15. Meta jsir tgħarbil għal attività androġenika potenzjali, is-sustanza kimika tat-test tingħata kuljum permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda (sc) għal perjodu ta' għaxart ijiem konsekuttivi. Is-sustanzi kimiċi tat-test jingħataw lil tal-inqas żewġ gruppi tal-kura ta' annimali sperimentali li jużaw livell wieħed ta' doża għal kull grupp. L-annimali huma nekropsjati madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża. Żieda statistikament sinifikanti f'żewġ piżijiet ta' organi fil-mira jew iktar tal-gruppi tas-sustanzi kimiċi tat-test imqabblin mal-grupp ta' kontroll veikolu tindika li s-sustanza kimika tat-test hija pozittiva għal attività androġenika potenzjali (Ara l-paragrafu 60). L-androġeni, bħal trenbolon, li ma jistax ikun 5α — ridott għandhom effetti li jinhassu iktar fuq l-LABC u l-GP meta mqabblin mat-TP, iżda t-tessuti kollha għandhom juru tkabbir mizjud.
16. Meta jsir tgħarbil għal attività antiandroġenika potenzjali, is-sustanza kimika tat-test tingħata kuljum permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-ġilda għal perjodu ta' għaxart ijiem konsekuttivi flimkien ma' dozi kuljum tat-TP (0,2 jew 0,4 mg/kg/jum) permezz ta' tilqima sc. Kien determinat fil-programm ta' validazzjoni li 0,2 jew 0,4 mg/kg/jum ta' TP jistgħu jintużaw peress li t-tnejn kienu effettivi fil-qbid ta' antiandroġeni u, għalhekk, doża waħda biss għandha tingħazel sabiex tintuza fl-assaġġ. Dozi approvati tas-sustanza kimika tat-test jingħataw lil tal-inqas tliet gruppi tal-kura mill-annimali sperimentali billi jintuza livell ta' doża wieħed għal kull grupp. L-annimali jiġu nekropsjati madwar 24 siegħa wara l-aħħar doża. Tnaqqis statistikament sinifikanti f'żewġ piżijiet ta' organi fil-mira jew iktar tas-sustanza kimika tat-test flimkien mal-gruppi tat-TP imqabblin mal-grupp ta' kontroll b'TP biss jindika li s-sustanza kimika tat-test hija pozittiva għal attività antiandroġenika potenzjali (Ara l-paragrafu 61).

▼ M5

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Għażla tal-ispeċi u r-razza

17. Il-far intuża spiss fil-Bijoassaġġ Hershberger sa mis-snin tletin. Għad li huwa bijoloġikament plawzibbli li kemm il-far kif ukoll il-gurdien juru risponsi simili, fuq il-bażi ta' 70 sena esperjenza bil-mudell tal-far, il-far huwa l-ispeċi tal-għażla għall-Bijoassaġġ Hershberger. Barra minn hekk, peress li d-dejta tal-Bijoassaġġ Hershberger tista' tkun preliminarj għal studju plurigenerazzjonali fit-tul, dan jippermetti sabiex annimali mill-istess speċi, razza u sors jintużaw fiż-żewġ studji.

18. Dan il-protokoll jippermetti sabiex il-laboratorji jagħzlu r-razza ta' far li għandha tintuża fl-assaġġ li ġeneralment għandha tkun dik użata storikament mil-laboratorju li jiehu sehem. Jistgħu jintużaw ir-razze ta' firien tal-laboratorju użati spiss; madankollu, razez li jimmaturaw ferm wara li jgħalqu t-42 jum ma għandhomx jintużaw peress li tiswija ta' dawn l-irġiel meta jkollhom 42 jum tista' tipprekludi l-kejl tal-piżijiet tar-ras tal-pene, li jista' jsir biss wara li l-prepuzju jiġi separat mill-korp tal-pene. B'hekk, razez li ġejjin mill-far Fisher 344 ma għandhomx jintużaw, hlief f'każijiet rari. Il-far Fisher 344 għandu durati differenti tal-fażijiet tal-iżvilupp sesswali meta mqabbel ma' razez oħrajn użati iktar spiss bħar-razze Sprague Dawley jew Wistar (16). Jekk tintuża din ir-razza, il-laboratorju għandu jsewwihom f'età f'it ikbar u għandu jkun kapaċi juri s-sensittività tar-razza użata. Ir-raġuni għall-għażla tar-razza tal-far għandha tiġi ddikjarata b'mod ċar mil-laboratorju. Meta l-assaġġ tat-tgħarbil jista' jkun preliminarj għal studju orali b'doza ripetuta, studju dwar ir-riproduzzjoni u l-iżvilupp, jew studju fit-tul, idealment intużaw annimali mill-istess razza u sors fl-istudji kollha.

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-għalf

19. Il-proċeduri kollha għandhom jikkonformaw mal-istandards lokali kollha dwar l-indukrar tal-annimali tal-laboratorju. Dawn id-deskrizzjonijiet ta' indukrar u kura huma standards minimi u ser jiġu sostitwiti minn regolamenti lokali iktar stringenti, bħad-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 (26). It-temperatura fil-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun 22 °C (b'medda ta' madwar ± 3 °C). L-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma għandhiex taqbeż massimu ta' 70 %, minbarra matul it-tindif tal-kamra. Il-mira għandha tkun umdità relattiva ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali. Is-sekwenza tad-dawl ta' kuljum għandha tkun ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam.

20. It-trobbija f'post fi grupp hija ppreferuta iktar minn iżolament minhabba l-età żgħira tal-annimali u l-fatt li l-firien huma annimali soċjali. It-trobbija fi grupp ta' żewġ jew tliet annimali f'kull gaġġa tevita ffullar u stress assoċjat li jistgħu jinterferixxu mal-kontroll ormonali tal-iżvilupp tat-tessut aċċessorju tas-sess. Il-gaġġ għandhom jitnaddfu sew biex jintehhew kontaminanti possibbli u jiġu rranġati b'tali mod li jiġu minimizzati l-effetti possibbli dovuti għall-pożizzjoni tal-gaġġa. Il-gaġġ ta' daqs xieraq (~2 000 ċentimetru kwadru) ser jevitaw iffullar.

21. Kull animal għandu jkun identifikat b'mod individwali (eż., marka jew tikketta mal-widna) billi jintuża metodu umanitarju. Il-metodu ta' identifikazzjoni għandu jiġi rreġistrat.

▼ M5

22. Id-dieta tal-laboratorju u l-ilma tajjeb għax-xorb għandhom jiġu pprovduti *ad libitum*. Il-laboratorju li jagħmlu l-Bijoassaġġ Hershberger għandhom jużaw id-dieta tal-laboratorju li normalment jużaw fil-hidma tagħhom ta' ttestjar ta' sustanzi kimiċi. Fl-istudji ta' validazzjoni tal-Bijoassaġġ, ma għew osservati ebda effett jew varjabbiltà li kienu attribwibbli għad-dieta. Id-dieta użata ser tiġi rreġistrata u għandu jinżamm kampjun tad-dieta tal-laboratorju għal analiżi possibbli fil-gejjieni.

Il-kriterji ta' prestazzjoni għal pizijiet ta' organi li jiddependi fuq androgen

23. Matul l-istudju ta' validazzjoni, ma kien hemm ebda evidenza li tnaqqis fil-piż tal-ġisem affettwa żidiet jew tnaqqisijiet fit-tkabbir tal-pizijiet tat-tessut għal tessuti fil-mira (jiġifieri, li għandhom jintiżnu f'dan l-istudju).
24. Fost ir-razez differenti ta' firien użati b'suċċess fil-programm ta' validazzjoni, il-pizijiet ta' organi li jiddependi fuq androgen huma ikbar fir-razez itqal ta' firien meta mqabblin ma' razez eħfef. Għalhekk, il-kriterji ta' prestazzjoni tal-Bijoassaġġ Hershberger ma jinkludux pizijiet tal-organi assoluti mistennija għal kontrolli pożittivi u negattivi.
25. Peress li l-Koeffiċjent tal-Varjazzjoni (CV) għal tessut għandu relazzjoni inversa mas-saħħa statistika, il-kriterji ta' prestazzjoni tal-Bijassaġġ Hershberger huma bbażati fuq valuri massimi tas-CV għal kull tessut (Tabella 1). Is-CVs jittiehdu mill-istudji ta' validazzjoni tal-OECD. Fil-każ ta' riżultati negattivi, il-laboratorji għandhom jeżaminaw is-CVs mill-grupp ta' kontroll u l-grupp ta' kura b'doża għolja biex jiddeterminaw jekk inqabzux il-kriterji ta' prestazzjoni massimi tas-CV.
26. L-istudju għandu jkun ripetut meta: 1) tlieta jew iktar mill-ghaxar CVs individwali possibbli fil-gruppi ta' kontroll u ta' kura b'doża għolja jaqbzux l-massimi magħżulin għal studji ta' agonisti u antagonisti fit-Tabella 1 u 2) tal-inqas żewġ tessuti fil-mira kienu marginalment insinifikanti, jiġifieri, valuri ta' p bejn 0,05 u 0,10.

Tabella 1

CVs massimi awtorizzabbli Determinati għat-Tessuti Aċċessorji tas-Sess fil-Mira għall-mudell imsewwi fl-Istudji ta' Validazzjoni tal-OECD ⁽¹⁾

Tessut	Effetti antiandroġeniċi	Effetti androġeniċi
Infafet seminali	40 %	40 %
Prostata ventrali	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Glandoli ta' Cowper	35 %	55 %
Ras tal-pene	17 %	22 %

⁽¹⁾ Is-CV limitu għal tessut partikolari ġie identifikat minn graff ta' valuri tas-CV — irrangat mill-izghar b'mod sekwenzjali sal-ikbar — għall-mezzi kollha mill-esperimenti kollha fl-eżerċizzju ta' validazzjoni billi ntuża mudell speċifiku (agonist jew antagonist). Is-CV limitu nqara mill-punt li fih l-inkrementi fin-nofs sal-ogħla CVs li jmiss fis-serje huma bil-bosta ikbar mill-fit CVs ta' qabel — il-“valur kritiku”. Ta' min jinnota li għad li din l-analiżi identifikat “valuri kritiċi” relattivament affidabbli għall-mudell ta' antagonist tal-assaġġ, il-kurvi tas-CV għall-assaġġ ta' agonist uriet zieda iktar uniformi sabiex b'hekk, l-identifikazzjoni ta' CV limitu b'dan il-metodu saret kemxejn arbitrarja.

▼M5

PROCEDURA

Konformità regolatorja u verifika tal-laboratorju

27. Għall-kuntrarju tal-assaġġ Uterotrofik (Kapitolu B.54 ta' dan l-Anness), wiri tal-konformità tal-laboratorju qabel it-tneġġja tal-istudju mhijiex neċessarja għall-assaġġ Hersberger għaliex kontrolli pożittivi (Testosteron Propjonat u Flutamid) u negattivi fl-istess hin isiru bħala parti integrali tal-assaġġ.

In-numru u l-kundizzjoni tal-annimali

28. Kull grupp ikkurat u tal-kontroll għandu jinkludi minimu ta' 6 annimali. Dan japplika kemm għall-protokoll androgeniku kif ukoll antiandrogeniku.

Tiswija

29. Għandu jkun hemm perjodu inizjali ta' akklimatizzazzjoni ta' bosta jiem wara r-riċevuta tal-annimali biex jiġi żgurat li l-annimali huma b'saħħithom u jkbr u sew. Peress li annimali msewwijin qabel ma jgħalqu 42 jum jew il-jum ta' wara t-twelid (pnd) 42 jistgħu ma jurux separazzjoni prepuzjali, l-annimali għandhom jissewwew fil-pnd 42 jew wara, u mhux qabel. L-annimali jissewwew taht anesteżija billi ssir inċiżjoni fl-iskrotu u jitnehhew iż-żewġ testikoli u l-epididimidi b'ligatura tal-vini tad-dem u l-passaġġi seminali. Wara l-konferma li ma jkun qed hemm l-ebda fsad, l-iskrotu għandu jingħalaq b'sutura jew autoclips. L-annimali għandhom jiġu kkurati b'analgeziċi għall-ewwel ftit jiem wara l-kirurġija biex tittaffa kwalunkwe skumdità ta' wara l-kirurġija. Jekk l-annimali msewwijin jinxtraw minn fornitur tal-annimali, l-età tal-annimali u l-istadju tal-maturità sesswali għandhom ikunu żgurati mill-fornituri.

Akklimatizzazzjoni wara t-tiswija

30. L-annimali għandhom ikompli bl-akklimatizzazzjoni fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju biex tkun tista' ssir ir-riġressjoni fil-piżijiet tat-tessut fil-mira għal tal-inqas 7 ijiem wara t-tiswija. L-annimali għandhom ikunu osservati kuljum, u kwalunkwe annimal b'evidenza ta' marda jew anormalitajiet fiżiċi għandu jitneħħa. B'hekk, il-kura permezz ta' bidu tad-dożaġġ (fil-istudju) tista' tibda mindu jgħalqu pnd 49 jum, iżda mhux wara l-pnd 60. L-età meta ssir in-nekropsija ma għandhiex tkun iktar mill-pnd 70. Din il-flessibilità tippermetti sabiex laboratorju jiskeda l-hidma sperimentali b'mod effiċjenti.

Piż tal-ġisem u gruppi aleatorji

31. Id-differenzi fil-piżijiet tal-ġisem individwali huma sors ta' varjabbiltà fil-piżijiet tat-tessut kemm fi hdan kif ukoll fost gruppi ta' annimali. Iż-żieda fil-varjabbiltà tal-piż tat-tessut tirriżulta f'koeffiċjent tal-varjazzjoni (CV) miżjud u tnaqqas is-saħħa statistika tal-assaġġ (kultant imsejha s-sensittività tal-assaġġ). Għalhekk, varjazzjonijiet fil-piż tal-ġisem għandhom ikunu kkontrollati kemm b'mod sperimentali kif ukoll statistiku.
32. Il-kontroll sperimentali jinvolvi l-produzzjoni ta' varjazzjonijiet żgħar fil-piż tal-ġisem fi hdan u fost il-gruppi ta' studju. L-ewwel nett, annimali żgħar jew kbar wisq għandhom jiġu evitati u ma jitqegħdux fil-grupp tal-istudju. Mal-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni tal-piż tal-annimali ma għandhiex taqbeż $\pm 20\%$ tal-piż medju (eż. $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$ għal firien peripubertali msewwijin). It-tieni, l-annimali għandhom ikunu assenjati fi gruppi (kemm ta' kontroll kif ukoll tal-kura) permezz ta' distribuzzjoni tal-piż b'mod aleatorju, sabiex il-piż medju tal-ġisem ta' kull grupp ma jkunx statistikament differenti minn xi grupp iehor. Il-proċedura blokk ta' tqassim aleatorju użata għandha tiġi rreġistrata.

▼ M5

33. Peress li t-tossicità tista' tnaqqas il-piż tal-ġisem tal-gruppi kkurati fir-rigward tal-grupp ta' kontroll, il-piż tal-ġisem fl-ewwel jum tal-ghoti tas-sustanza kimika tat-test jista' jintuża bħala kovarjant statistiku, mhux il-piż tal-ġisem fin-nekropsija.

Dożaġġ

34. Sabiex jiġi stabbilit jekk sustanza kimika tat-test jistax ikollha azzjoni androġenika *in vivo*, żewġ gruppi ta' doża tas-sustanza kimika tat-test flimkien ma' kontrolli pozittivi u veikoli (negattivi) (Ara l-paragrafu 43) normalment ikunu biżżejjed, u għalhekk, dan id-disinn huwa ppreferut għal raġunijiet ta' benessri tal-annimali. Jekk l-iskop ikun li jew tinkiseb kurva ta' rispons għad-doża jew li ssir estrapolazzjoni għal dozi inferjuri, tal-inqas ikun hemm bżonn ta' 3 gruppi ta' doża. Jekk ikun hemm bżonn ta' informazzjoni minbarra identifikazzjoni tal-attività androġenika (bħal stima tal-potenza), għandha tiġi kkunsidrata skeda differenti tad-dożaġġ. Biex isiru testijiet għal antiandroġeni, is-sustanza kimika tat-test tingħata flimkien ma' agonist tal-androġen ta' referenza. Għandhom jintużaw tal-inqas 3 gruppi ta' ttestjar b'dozi differenti tas-sustanza kimika tat-test u kontroll pozittiv u negattiv (Ara l-paragrafu 44). Hlief għat-trattament bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll għandhom jitqandlu bl-istess mod bħas-suġġetti tal-grupp tat-test. Jekk jintuża veikolu fl-ghoti tas-sustanza kimika tat-test, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-oghla volum użat bil-gruppi tat-test.

35. Il-livelli kollha ta' doża għandhom ikunu proposti u jingħaḥlu filwaqt li tittiehed f'kunsiderazzjoni kwalunkwe dejta (tossiko)kinetika u dwar it-tossicità eżistenti u għad-dispożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test jew materjali relatati. L-ewwel nett, l-oghla livell ta' doża għandu jiehu f'kunsiderazzjoni l-LD₅₀ u/jew informazzjoni dwar it-tossicità akuta sabiex jiġu evitati mewt, tbatija severa jew diffikultà fl-annimali (17)(18)(19)(20) u, it-tieni, jiehu f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni disponibbli dwar id-dozi użati fi studji sottokroniċi u kroniċi. B'mod ġenerali, l-oghla doża ma għandhiex tikkaguna tnaqqis fil-piż finali tal-ġisem tal-annimali iktar minn 10 % tal-piż ta' kontroll. L-oghla doża għandha tkun jew 1) l-oghla doża li tiżgura sopravvivenza tal-annimali u li hija mingħajr tossicità jew diffikultà importanti għall-annimali wara 10 ijiem konsekuttivi ta' għoti sa doża massima ta' 1 000 mg/kg/jum (Ara l-paragrafu 36) jew 2) doża li tinduċi effetti (anti)androġeniċi, skont liema tkun l-inqas. Għat-tgħarbil, intervalli kbar, eż. unitajiet ta' nofs log (li jikkorrispondu għal progressjoni tad-doża ta' 3,2) jew anki unitajiet ta' log wahda, bejn dożaġġi ġeneralment huma aċċettabbli. Jekk ma hemm ebda dejta xierqa disponibbli, jista' jsir studju ta' sejbien tal-medda (Ara l-paragrafu 37) biex jgħin fid-determinazzjoni tad-dozi li għandhom jintużaw.

Livell tad-doża ta' limitu

36. Jekk test fid-doża ta' limitu ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum u doża inqas li juża l-proċeduri deskritti għal dan l-istudju jonqos milli jipproduċi bidla statistikament sinifikanti fil-piżijiet tal-organi riproduttivi, f'dak il-każ, livelli addizzjonali ta' dozi jistgħu jitqiesu mhux neċessarji. Id-doża ta' limitu tapplika hlief meta dejta dwar esponiment tal-bniedem tindika l-bżonn li jintuża livell ta' doża oghla.

Kunsiderazzjonijiet għas-sejba tal-medda

37. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jsir studju preliminari ta' sejbien tal-medda bi ftit annimali sabiex jingħaḥlu gruppi ta' doża xierqa [billi jintużaw metodi għall-ittestjar tat-tossicità akuta (Kapitolu B.1 bis, B.1 tris ta' dan l-Anness (27), TG tal-OECD Nru 425 (19))]. L-għan fil-każ tal-Bijoassaġġ Hershberger huwa li jagħmel dozi li jiżguraw sopravvivenza tal-annimali u li huma hielsa minn tossicità jew diffikultà importanti għall-annimali wara għaxart

▼ M5

ijjem konsekuttivi ta' għoti tas-sustanza kimika sa doża limitu ta' 1 000 mg/kg/jum kif stipulat fil-paragrafi 35 u 36. F'dan ir-rigward jista' jintuża Dokument Gwida tal-OECD (17) li jiddefinixxi sinjali kliniċi li jindikaw tossiċità jew diffikultà fl-annimali. Jekk fattibbli fi hdan dan l-istudju ta' sejbiën tal-medda wara ghaxart ijiem ta' għoti, it-tessuti fil-mira jistgħu jinqatgħu u jintiżnu madwar 24 siegħa wara li tingħata l-aħħar doża. Imbagħad din id-dejta tkun tista' tintuża biex tghin fl-ghażla tad-doži fil-istudju ewlieni.

Sustazi kimiċi ta' referenza u veikolu

38. L-agonist tal-androġen ta' referenza għandu jkun Testosteron Propjonat (TP), Nru tas-CAS 57-82-5. Id-dożaġġ ta' referenza tat-TP jista' jkun jew 0,2 mg/kg-bw/jum jew inkella 0,4 mg/kg-bw/jum. L-antagonist tal-androġen ta' referenza għandu jkun Flutamid (FT), Nru tas-CAS 1311-84-7. Id-dożaġġ ta' referenza tal-FT għandu jkun ta' 3 mg/kg-bw/jum, u l-FT għandu jingħata flimkien mad-dożaġġ ta' referenza tat-TP.
39. Huwa rakkomandat li, kull fejn ikun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni milwiema/sospensjoni. Madankollu, peress li hafna ligandi tal-androġeni jew il-prekursuri metabolici tagħhom għandhom it-tendenza li jkunu idrofobiċi, l-iktar approċċ komuni huwa li tintuża soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż. żejt tal-qamhbirun, tal-karawett, tal-guñglien jew taż-zebbuġ). Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jinħallu f'ammont minimu ta' 95 % etanol jew solventi xierqa oħrajn u jiġu dilwiti f'koncentrazzjonijiet ta' użu finali fil-veikolu tat-test. Il-karatteristiċi tossiċi tas-solvent għandhom ikunu magħrufin, u għandhom ikunu ttestjati fi grupp ta' kontroll separat b'solvent biss. Jekk is-sustanza kimika tat-test titqies stabbli, tista' tintuża azzjoni mekkanika hafifa ta' tishin u b'saħħitha biex tghin halli tinħall is-sustanza kimika tat-test. Għandha tiġi determinata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu. Jekk is-sustanza kimika tat-test hija stabbli għad-durata tal-istudju, ikun jista' jithejja alikwot tal-bidu tas-sustanza kimika tat-test, u d-dilwizzjonijiet speċifikati tad-dożaġġ ippreparati ta' kuljum b'attenzjoni biex jiġu evitati kontaminazzjoni u hela tal-kampjuni.

L-ghoti tad-doži

40. It-TP għandu jingħata permezz ta' tilqima taħt il-gilda, u l-FT permezz ta' gavage orali.
41. Is-sustanza kimika tat-test tingħata permezz ta' gavage orali jew tilqima taħt il-gilda. Kunsiderazzjonijiet dwar il-benessri tal-annimali u l-proprietajiet fiżiċi/kimiċi tas-sustanza kimika tat-test iridu jitqiesu meta tingħażel ir-rotta tal-amministrazzjoni. Barra minn hekk, għandhom jittiehdu f'kunsiderazzjoni aspetti tossikoloġiċi bħar-relevanza għar-rotta ta' esponiment tal-bniedem għas-sustanza kimika (eż. gavage orali biex tiġi simulata ingestjoni, tilqima taħt il-gilda biex jiġi simulat tehid man-nifs jew adsorbiment dermal) u informazzjoni tossikoloġika eżistenti u dejta dwar il-metaboliżmu u l-kinetika (eż. il-bżonn li jiġi evitat metaboliżmu first pass, effiċjenza aħjar b'rotta partikolari) qabel ma jinbada ttestjar estensiv fit-tul, jekk jinkisbu riżultati pozittivi permezz tat-tilqima.
42. L-annimali għandhom jingħataw doża bl-istess mod u sekwenza ta' hin għal ghaxart ijiem konsekuttivi b'intervalli ta' madwar 24 siegħa. Il-livell ta'dożaġġ għandu jiġi aġġustat kuljum fuq il-baži tal-kejl konkurrenti ta' kuljum tal-piż tal-ġisem. Il-volum tad-doża u l-hin li tingħata għandu jiġi rreġistrat f'kull jum ta' esponiment. Għandha tingħata attenzjoni sabiex ma tinqabiżx id-doża massima deskritta fil-paragrafu 35 biex tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Tnaqqis fil-piż tal-ġisem, sinjali kliniċi u sejbiet oħrajn għandhom jiġu vvalutati f'dettall f'dan ir-rigward. Għal gavage

▼ M5

orali, għandhom jintużaw tubu tal-istonku jew cannula xierqa ta' intubazzjoni. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata f'darba jiddependi mid-daqs tal-animall tat-test. Għandhom ikunu segwiti l-linji gwida lokali dwar l-indukrar tal-animalli, iżda l-volum ma għandux jaqbeż il-5 ml/kg piż tal-ġisem, hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet milwiema fejn jista' jintuża 10 ml/kg piż tal-ġisem. Għal tilqimiet taħt il-ġilda, id-dożi għandhom jingħataw fir-reġjuni dorsoskapulari u/jew lombari permezz ta' labra sterili (eż. ħxuna ta' 23 jew 25) u siringa tuberkulina. It-tqaxxir tas-sit tat-tilqima huwa fakultattiv. Għandhom jiġu rreġistrati kwalunkwe telf, tnixxija fis-sit tat-tilqima jew dożaġġ inkomplut. Il-volum totali injettat lil kull far kuljum ma għandux jaqbeż iż-0,5 ml/kg piż tal-ġisem.

Proċeduri speċifiċi għal agonisti tal-androġen

43. Għat-test għal agonisti tal-androġen, il-veikolu huwa l-kontroll negattiv, u l-grupp ikkurat b'TP huwa l-kontroll pożittiv. L-attività bijoloġika konsistenti ma' agonisti tal-androġen hija ttestjata bl-ghoti ta' sustanza kimika tat-test lil gruppi tal-kura bid-dożi magħżulin għal 10 ijiem konsekuttivi. Il-piżijiet tal-hames tessuti aċċessorji tas-sess mill-gruppi tas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mal-grupp veikolu għal zidiet statistikament importanti fil-piż.

Proċeduri speċifiċi għal antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5 α -ridottasi

44. Għat-test għal antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5 α -ridottasi, il-grupp ikkurat b'TP huwa l-kontroll negattiv, u l-grupp koamministrat bid-dożi ta' referenza tat-TP u l-FT huwa l-kontroll pożittiv. L-attività bijoloġika konsistenti ma' antagonisti tal-androġen u inibituri ta' 5 α -ridottasi hija ttestjata billi tingħata doża ta' referenza ta' TP u bl-ghoti tas-sustanza kimika tat-test għal 10 ijiem konsekuttivi. Il-piżijiet tal-hames tessuti aċċessorji tas-sess mit-TP flimkien mal-gruppi tas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mal-grupp ta' referenza b'TP biss għal tnaqqisijiet statistikament sinifikanti fil-piżijiet.

OSSERVAZZJONIJIET

Osservazzjonijiet kliniċi

45. Osservazzjonijiet kliniċi generali għandhom isiru tal-inqas darba kuljum u b'mod iktar spiss meta jkunu osservati sinjali ta' tossiċità. Idealment, l-osservazzjonijiet għandhom isiru fl-istess hin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu tal-oghla effetti anticipati wara d-dożaġġ. L-animalli kollha għandhom jiġu osservati għall-mortalità, il-morbidità u sinjali kliniċi generali bħal bidlet fl-imġiba, il-ġilda, il-pil, l-ghajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u l-attività awtonomika (eż. dmugh, piloerezzjoni, daqs tal-habba, mudell respiratorju mhux tas-soltu).
46. Kwalunkwe animall li jinstab mejjet għandu jitneħħa u jiġi dispost mingħajr analiżi ulterjuri tad-dejta. Kwalunkwe mortalità tal-animalli qabel in-nekropsija għandha tkun inkluża fir-registru tal-istudju ma' kwalunkwe raġuni apparenti għall-mortalità. Kwalunkwe animall moribond għandu jinqatel b'mod dinjituż. Kwalunkwe animall moribond li mbagħad jiġi ewtanizzat għandu jkun inkluż fir-registru tal-istudju bir-raġunijiet apparenti għall-morbidità.

▼ M5

Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel

47. L-annimali kollha għandhom jintiżnu kuljum sal-eqreb 0,1 g, b'bidu eżatt qabel ma tinbeda l-kura, jiġifieri meta -annimali jitqassmi fi gruppi. Bħala kejl fakultattiv, l-ammont ta' ikel ikkonsmat matul il-perjodu tal-kura jista' jitkejjel skont kull gaġġa billi jintiżnu dawk li jitgħalfu. Ir-riżultati tal-konsum tal-ikel għandhom jingħataw fi grammi għal kull far kull jum.

Dissezzjoni u kejl tal-piżijiet tat-tessuti u tal-organi

48. Madwar 24 siegħa wara l-aħhar għoti tas-sustanza kimika tat-test, il-firien għandhom jiġu ewtanizzati u żvinati skont il-proċeduri normali tal-kondotta fil-laboratorju, u għandha ssir in-nekropsija. Il-metodu ta' qtil dinjitu għandu jiġi rreġistrat fir-rapport tal-laboratorju.

49. Idealment, l-ordni ta' nekropsija għandha tkun aleatorja fost il-gruppi biex tiġi evitata progressjoni direttament 'il fuq jew 'l isfel ta' gruppi ta' doża li tista' taffettwa d-dejta. Kwalunkwe sejba fin-nekropsija, jiġifieri bidliet patoloġiċi/lezjonijiet viżibbli għandha titniżżel u tiġi rreġistrata.

50. Il-hames tessuti li jiddependu fuq l-androġen (VP, SV, LABC, COW, GP) għandhom jintiżnu. Dawn it-tessuti għandhom jinqatgħu, jitraqqmu bi preċiżjoni mit-tessut u x-xaham imqabbad żejjed, u għandhom jiġu determinati l-piżijiet friski (mhux fissati) tagħhom. Kull tessut għandu jitqandel b'attenzjoni partikolari biex jiġi evitat it-telf ta' fluwidi u biex tiġi evitata desikkazzjoni, li tista' tintroduċi żbalji importanti u varjabbiltà billi jitnaqqsu l-piżijiet irreġistrati. Hafna mit-tessuti jistgħu jkunu żgħar hafna jew diffiċli wisq biex issirilhom dissezzjoni, u dan ser jintroduċi varjabbiltà. Għalhekk, importanti li l-persuni li jagħmlu d-dissezzjoni tat-tessuti aċċessorji tas-sess ikunu midhla tal-proċeduri standard ta' dissezzjoni għal dawn it-tessuti. Manwal tal-proċedura standard tal-operazzjoni (SOP) għad-dissezzjoni huwa disponibbli mill-OECD (21). Tahriġ attent skont il-gwida dwar l-SOP ser inaqqas sors potenzjali ta' varjazzjoni fl-istudju. Idealment, l-istess prosettur għandu jkun responsabbli għad-dissezzjoni ta' tessut partikolari biex jiġu eliminati differenzi bejn individwi fl-ipproċessar tat-tessuti. Jekk dan ma jkunx possibbli, in-nekropsija għandha titfassal b'tali mod li kull prosettur jagħmel dissezzjoni ta' tessut partikolari mill-gruppi tal-kura kollha u mhux għal individwu wiehied li jagħmel dissezzjoni tat-tessuti kollha minn grupp ta' kontroll, filwaqt li haddiehor ikun responsabbli għall-grupp ikkurat. Kull tessut aċċessorju tas-sess għandu jintiżen mingħajr tnixxif sal-eqreb 0,1 mg, u l-piżijiet iridu jiġu rreġistrati għal kull annimali.

51. Hafna mit-tessuti jistgħu jkunu żgħar hafna jew diffiċli wisq biex issir dissezzjoni tagħhom, u dan ser jintroduċi varjabbiltà. Hidma fl-imghoddi indikat medda ta' koeffiċjent tal-varjazzjonijiet (CVs) li donnu jvarja fuq il-bażi tal-profiċjenza tal-laboratorju. Fi ftit każijiet, fi hdan laboratorju partikolari ġew osservati differenzi kbar fil-piżijiet assoluti tat-tessuti bħall-VP u s-COWS.

52. Il-kejl ta' fwied, kilwa f'par u adrenali f'par huwa fakultattiv. Mill-gdid, it-tessuti għandu jitneħħilhom kwalunkwe fascia u xaham imqabbad magħhom. Il-fwied għandu jintiżen u jiġi rreġistrat sal-eqreb 0,1 g u l-kliwie f'par u l-adrenali f'par għandhom jintiżnu u jiġu rreġistrati sal-eqreb 0,1 mg. Il-fwied, il-kilwa u l-adrenali mhumix influwenzati minn androġeni biss; jipprovdu wkoll ħjiliet utli ta' tossiċità sistemika.

▼ M5

53. Il-kejl tal-ormon luteinizanti tas-serum (LH), l-orom li jstimola l-follikoli (FSH) u t-testosteron (T) huwa fakultattiv. Il-livelli tas-serum T huma utli biex jiġi determinat jekk is-sustanza kimika tat-test tinduċi metabolizmu tal-fwied ta' testosteron, li jbaxxi l-livelli tas-serum. Mingħajr id-dejta T, effett bħal dan jista' jidher li ġej minn mekkanizmu antiandroġeniku. Il-livelli tal-LH jipprovdu informazzjoni dwar il-hila ta' antiandroġenu sabiex mhux biss jonqsu l-pizijiet tal-organi, iżda anki sabiex tiġi affettwata l-funzjoni ipotalamika-pitwitarja, li fi studji fit-tul tista' tinduċi tumuri fit-testikoli. L-FSH huwa ormon importanti għall-ispermatogenezi. Is-serum T4 u T3 huma kejl fakultattiv ukoll li jipprovdi informazzjoni supplimentari utli dwar il-hila li tiġi interrotta omeostażi tal-orom tat-tirojde. Jekk ser isiru l-kejl tal-oromon, il-firien għandhom jiġu anestetizzati qabel in-nekropsija u għandu jittiehed id-demm permezz ta' titqiba kardijaka, u l-metodu tal-anesteżija għandu jingħażel b'attenzjoni sabiex ma jaffettwax il-kejl tal-ormon. Il-metodu tat-thejjija tas-serum, is-sors tar-radjuimmunoassaġġ jew kits oħrajn ta' kejl, il-proċeduri analitiċi, u r-riżultati għandhom jiġu rreġistrati. Il-livelli tal-LH għandhom jiġu rrapportati bħala ng għal kull ml serum, u l-livell ta' T għandu jiġi rrapportat ukoll bħala ng għal kull ml serum.

54. Id-dissezzjoni tat-tessuti hija deskritta kif ġej bi gwida dettaljata ta' dissezzjoni b'ritratti ppubblikati bħala materjali supplimentari bħala parti mill-programm ta' validazzjoni (21). Hemm ukoll vidjo ta' dissezzjoni għad-dispożizzjoni mill-paġna fuq il-web tal-Korea Food and Drug Administration (22).

— Bil-wiċċ ventrali tal-annimal ihares 'il fuq, ara jekk il-prepuzju tal-pene isseparax mir-ras tal-pene. Jekk iva, imbagħad dahhal lura l-prepuzju u nehhi r-ras tal-pene, ižen (sal-eqreb 0,1 mg), u rreġistra l-piż,

— Iftaħ il-ġilda u l-hajt tal-addome, biex tesponi l-vixxri. Jekk l-organi fakultattivi jintiżnu, nehhi u ižen il-fwied sal-eqreb 0,1 g, nehhi l-istonku u l-intestini u ižen il-kliewi f'par u l-adrenali f'par sal-eqreb 0,1 mg. Din id-dissezzjoni tesponi l-apparat tal-urina u tibda d-dissezzjoni tat-tessuti accessorji fil-mira tar-ragel,

— Biex tagħmel dissezzjoni tal-VP, issepara l-apparat tal-urina mis-saff tal-muskolu ventrali billi taqta' t-tessut konnettiv tul il-linja tan-nofs. Ćaqraq l-apparat tal-urina lura lejn in-nuffati seminali (SV), biex tikxef il-lobi tax-xellug u tal-lemin tal-prostata ventrali (miksija b'saff xaham). Bil-mod iġbed ix-xaham mil-lobi tal-lemin u tax-xellug tal-VP. Bir-reqqa ċaqraq il-lobu tal-lemin tal-VP mill-uretra u aghmel dissezzjoni tal-lobu mill-uretra. Filwatq li tibqa' żżomm il-lobu tal-lemin tal-VP, bil-mod ċaqraq il-lobu tax-xellug tal-VP mill-uretra u mbagħad aghmel dissezzjoni; ižen sal-eqreb 0,1 mg u rreġistra l-piż,

— Biex tagħmel dissezzjoni tal-SVCG, ċaqraq l-apparat tal-urina lejn id-denb, biex tesponi l-vas deferens u l-lobi tal-lemin u tax-xellug tan-nuffati seminali flimkien mal-glandoli koagulanti (SVCG). Evita tnixxija ta' fluwidu billi ssodd b'emostata fil-baži tal-SVCGs, fejn il-vas deferens jingħaqad mal-uretra. Bil-mod aghmel dissezzjoni tal-SVCGs, bl-emos-tata f'postha nehhi x-xaham u l-adnexa, qiegħed fużin tat-tara, nehhi l-emos-tata, u ižen sal-eqreb 0,1 mg u rreġistra l-piż,

▼ M5

- Biex taghmel dissezzjoni tal-muskoli reffiegħa bulbokavernosi ani plus (LABC), il-muskoli u l-baži tal-pene jiġu esposti. Il-muskoli LA jiksu l-kolon, filwaqt li l-muskoli anterjuri tal-LA u l-BC jaqdbu mal-basal tal-pene. Il-ġilda u l-adnexa mir-reġjuni perianali li jestendi mill-baži tal-pene sat-tarf anterjuri tal-anus jitnehhew. Il-muskoli tal-BC jiġu dissezzjonati b'mod gradwali mill-basla u t-tessuti tal-pene. Il-kolon tinqata' fi tnejn u, l-LABC shah jistgħu jiġu dissezzjonati u jitnehhew. L-LABC għandu jitnehhilhom ix-xaham u l-adnexa, jintiżnu sal-eqreb 0,1 mg, u jiġi rreġistrat il-piż tagħhom,
 - Wara li jitnehhew l-LABC, il-glandoli ttondjati ta' Cowper jew bulbo-retrali (COW) isiru viżibbli fil-baži ta', u ftit dorsali għal, basal tal-pene. Hemm bżonn li ssir dissezzjoni bir-reqqa biex jiġi evitat milli tintlaqat il-kapsula rqiqha halli tiġi evitata tnixxija ta' fluwidi. Iżen is-COW f'par sal-eqreb 0,1 mg, u rreġistra l-piż,
 - Barra minn hekk, jekk jintilef fluwidu minn xi glandola matul in-nekropsija u d-dissezzjoni, dan għandu jiġi rreġistrat.
55. Jekk l-evalwazzjoni ta' kull sustanza kimika tkun tehtieg nekropsija ta' iktar annimali minn dak li huwa raġonevoli għal jum wiehed, il-bidu tal-istudju jista' jkun imxekkel għal jumejn konsekuttivi, u dan jirriżulta fix-xekkil tan-nekropsija u l-hidma relatata għal jumejn. Jekk ikun hemm xekkil bħal dan, għandhom jintużaw nofs l-annimali għal kull grupp tal-kura kull jum.
56. Għandha ssir dispożizzjoni b'mod xieraq tal-karkassi wara n-nekropsija.

RAPPORTAR

Dejta

57. Id-dejta għandha tiġi rrapportata b'mod individwali (jiġifieri l-piż tal-ġisem, il-piżijiet tat-tessut aċċessorju tas-sesss, kejljet fakultattivi u risponsi u osservazzjonijiet oħrajn) u għal kull grupp ta' annimali (medji u devjazzjonijiet standard ta' kull kejl meħud). Id-dejta għandha tingabar fil-qosor f'forma ta' tabella. Id-dejta għandha turi n-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjubin mejtin matul it-test jew misjubin li qed juru sinjali ta' tossiċità, deskrizzjoni tas-sinjali ta' tossiċità osservati, inkluzi l-hin tal-bidu, id-durata u s-severità.
58. Rapport finali għandu jinkludi:

Facilità tal-ittestjar

- Isem il-facilità, il-post,
- Id-direttur tal-istudju u persunal ieħor u r-responsabilitajiet ta' studju tiegħu,
- Id-dati li fihom beda u ntemm l-istudju, jiġifieri l-ewwel jum tal-ghoti tas-sustanza kimika tat-test u l-aħħar jum ta' nekropsija, rispettivament.

Sustanza kimika tat-test

- Is-sors, in-numru tal-lott, l-identità, il-purità, l-indirizz shiħ tal-fornitur u l-karatterizzazzjoni tas-sustanza/i kimika/kimiċi,
- L-ghamla fizika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi,
- Il-kundizzjonijiet ta' ħzin u l-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tad-dilwizzjoni,
- Kwalunkwe dejta ġġenerata fuq l-istabbiltà,
- Kwalunkwe analiżi tas-soluzzjonijiet/sospensjonijiet tad-dozaġġ.

▼ **M5***Veikolu*

- Il-karatterizzazzjoni tal-veikolu (identità, fornitur u Nru tal-lott),
- Ġustifikazzjoni tal-ġhażla tal-veikolu (jekk mhuwiex ilma).

Annimali tat-test u proċeduri ta' trobbija tal-annimali

- L-ispeċi/ir-razza użata u r-raġuni għall-ġhażla,
- Is-sors jew il-fornitur tal-annimali, inkluż l-indirizz shih,
- In-numru u l-età tal-annimali forniti,
- Il-kundizzjonijiet fil-post tat-trobbija (temperatura, dawl, u l-bqija),
- Id-dieta (isem, tip, fornitur, numru tal-lott, kontenut u, jekk magħrufin, il-livelli ta' fitoestrogeni),
- Il-bejta (isem, tip, fornitur, kontenut),
- Il-kundizzjonijiet fil-ġaġeġ u n-numru ta' annimali f'kull ġaġeġ.

Kundizzjonijiet tal-Assaġġ

- L-età tat-tiswija u d-durata tal-akklimatizzazzjoni wara t-tiswija,
- Il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tal-istudju (sal-eqreb 0,1 g),
- Il-proċess ta' tqassim aleatorju u rekord tal-assenjament għal veikolu, referenza, gruppi tas-sustanza kimika tat-test, u ġaġeġ,
- Devjazzjoni medja u standard tal-piżijiet tal-ġisem għal kull grupp għal kull jum li jintiżnu fih tul l-istudju kollu,
- Ir-raġuni għall-ġhażla tad-doża,
- Ir-rotta tal-amministrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u r-raġuni għall-ġhażla tar-rotta ta' esponiment,
- Jekk assaġġ għall-antiandroġeniċità, it-trattament bit-TP (doża u volum),
- It-trattament bis-sustanza kimika tat-test (doża u volum),
- Il-ħin tad-dożaġġ,
- Il-proċeduri tan-nekropsija, inklużi mezzi ta' żvinar u kwalunkwe anesteżija,
- Jekk isiru analizijiet tas-serum, għandhom jiġu pprovduti dettalji dwar il-metodu. Pereżempju, jekk tintuża l-RIA, għandhom jiġu rrapportati l-proċedura tal-RIA, is-sors tal-kits tal-RIA, id-dati ta' skadenza tal-kits, il-proċedura għall-ġhadd tax-xintillar, u l-istandardizzazzjoni.

Riżultati

- L-osservazzjonijiet ta' kuljum għal kull animal matul id-dożaġġ, inklużi:
- Il-piżijiet tal-ġisem (sal-eqreb 0.1 g),
- Is-sinjali kliniċi (jekk ikun hemm),
- Kwalunkwe kejl jew noti ta' konsum tal-ikel.
- L-osservazzjonijiet fin-nekropsija għal kull animal, inklużi:

▼ M5

- Id-data tan-nekropsija,
- Il-grupp tal-kura tal-annimali,
- L-ID tal-annimali,
- Il-prosettur,
- Il-hin tal-ġurnata li fih isiru n-nekropsija u d-dissezzjoni,
- L-età tal-annimali,
- Il-piż tal-ġisem finali fin-nekropsija, filwaqt li jiġu osservati kwalunkwe zieda jew tnaqqis statistikament sinifikanti,
- L-ordni tal-iżvinar u d-dissezzjoni tal-annimali fin-nekropsija,
- Il-pizijiet tal-ħames tessuti fil-mira li jiddependu fuq l-androġen:
- Il-prostata ventrali (sal-eqreb 0,1 mg),
- In-nuffati seminali flimkien mal-glandoli koagulanti, inkluż fluwidu (f'pari, sal-eqreb 0,1 mg),
- Il-kumpless tal-muskolu reffiegh bulbokavernosu ani plus (sal-eqreb 0.1 mg),
- Il-glandoli ta' Cowper (piż frisk — f'pari, sal-eqreb 0,1 mg),
- Ir-ras tal-pene (piż frisk sal-eqreb 0,1 mg);
- Il-pizijiet tat-tessuti fakultattivi, jekk isiru:
- Il-fwied (sal-eqreb 0,1 g),
- Il-kilwa (f'pari, sal-eqreb 0,1 mg),
- Adrenali (f'pari, sal-eqreb 0,1 mg);
- Rimarki u kummenti ġenerali,
- Analizijiet tal-ormoni tas-serum, jekk isiru.
 - Serum LH (fakultattiv — ng għal kull ml serum), u
 - Serum T (fakultattiv — ng għal kull ml serum);
- Rimarki u kummenti ġenerali.

Sommarju tad-dejta

Id-dejta għandha tingabar f'sommarju f'forma ta' tabella li jkun fiha d-daqs tal-kampjun għal kull grupp, il-medja tal-valur, u l-iżball standard tad-devjazzjoni medja jew standard. It-tabelli għandhom jinkludu pizijiet tal-ġisem fin-nekropsija, il-bidliet fil-piż tal-ġisem mill-bidu tad-dożaġġ san-nekropsija, il-pizijiet tat-tessuti aċċessorji tas-sess fil-mira, u kwalunkwe piż fakultattiv ta' organi.

*Diskussjoni tar-riżultati***Analizi tar-riżultati**

59. Il-pizijiet tal-ġisem u l-organi fin-nekropsija għandhom jiġu analizzati b'mod statistiku għal karatteristiċi bħall-omoġenità tal-varjanza bi trasformazzjonijiet xierqa tad-dejta kif ikun hemm b'żonn. Il-gruppi tal-kura għandhom jitqabblu ma' grupp ta' kontroll billi jintużaw tekniki bħal ANOVA segwiti minn tqabbil bejn pari (eż. it-test 'one tailed' ta' Dunnett) u l-kriterju għad-differenza statistika, pereżempju, $p \leq 0,05$. Dawk il-gruppi li jiksbu importanza statistika għandhom jiġu identifikati. Madankollu, pizijiet ta' "organi relattivi" għandhom jiġu evitati minħabba s-suppożizzjonijiet statistiċi invalidi li jinsabu fil-qalba ta' din il-manipulazzjoni tad-dejta.

▼ M5

60. Għall-agoniżmu tal-androġen, il-kontroll għandu jkun il-grupp tat-test b'veikolu biss. Il-karatteristiċi tal-mod ta' azzjoni ta' sustanza kimika tat-test jistgħu jwasslu għal risponsi relattivi differenti bejn it-tessuti, pereżempju trenbolon, li ma jistgħux ikunu 5 alfa-ridotti, għandu effetti li jinhassu iktar fuq l-LABC u l-GP meta mqabbel mat-TP. Żieda statistikament importanti ($p \leq 0,05$) fi kwalunkwe tnejn jew iktar mill-hames pizijiet tat-tessuti fil-mira li jiddependu fuq androġen (VP, LABC, GP, CG u SVCG) għandha titqies riżultat ta' agonist tal-androġen pożittiv, u t-tessuti kollha fil-mira għandhom juru xi grad ta' tkabbir miżjud. Evalwazzjoni kombinata tar-risponsi tat-tessuti tal-organi sesswali aċċessorji kollha (ASO) tista' tinkiseb billi ssir analiżi xierqa tad-dejta plurivarjata. Din tista' ttejjeb l-analiżi, speċjalment f'kazijiet fejn tessut wiehed biss jagħti rispons statistikament importanti.
61. Għall-antagoniżmu tal-androġen, il-kontroll għandu jkun il-grupp tat-test tal-androġen ta' referenza (testosteron propjonat biss). Il-karatteristiċi tal-mod ta' azzjoni ta' sustanza kimika tat-test jistgħu jwasslu għal risponsi relattivi differenti bejn it-tessuti, pereżempju inibituri ta' 5 alfa α -ridottasi, bħal finasterid, għandhom effetti li jinhassu iktar fuq il-prostata ventrali milli tessuti oħrajn meta mqabblin ma' antagonisti qawwijin tal-AR, bħal flutamid. Tnaqqis statistikament importanti ($p \leq 0,05$) fi kwalunkwe tnejn jew iktar mill-hames pizijiet tat-tessuti fil-mira li jiddependu fuq l-androġen (VP, LABC, GP, CG u SVCG) relatat mat-trattament bit-TP wahdu għandu jitqies bħala riżultat tal-antagonist tal-androġen pożittiv u t-tessuti kollha fil-mira għandhom juru xi grad ta' tkabbir imnaqqas. L-evalwazzjoni kombinata tar-risponsi kollha tat-tessut għall-ASO jistgħu jiġu arkivjati billi tintuza analiżi xierqa tad-dejta plurivarjata. Din tista' ttejjeb l-analiżi, speċjalment f'kazijiet fejn tessut wiehed biss jagħti rispons statistikament importanti.
62. Id-dejta għandha tingabar fil-qosor f'forma ta' tabella li jkun fiha l-medja, l-izball standard tal-medja (devjazzjoni standard tkun aċċettabbli wkoll) u d-daqs tal-kampjun għal kull grupp. It-tabelli ta' dejta individwali għandhom ikunu inkluzi wkoll. Il-valuri individwali, il-medja, il-valuri ta' SE (SD) u CV għad-dejta tal-kontroll għandhom jiġu eżaminati biex jiġi determinat jekk jilhqax kriterji aċċettabbli għal konsistenza ma' valuri storiċi mistennijin. CVs li jaqbzu l-valuri tas-CV elenkati fit-Tabella 1 (ara l-paragrafi 25 u 26) għal kull piz tal-organu għandhom jiddeterminaw jekk hemmx żbalji fir-registrazzjoni jew it-tidhil tad-dejta jew jekk il-laboratorju għadux lahaq livell eċċezzjonali ta' dissezzjoni preċiża tat-tessuti li jiddependu fuq l-androġen u jekk hemmx bżonn ta' iktar taħriġ/prattika. Generalment, CVs (id-devjazzjoni standard maqsuma bil-piż medju tal-organi) huma riproduttibbli minn laboratorju għal ieħor u minn studju għal ieħor. Id-dejta ppreżentata għandha tinkludi tal-inqas: il-pizijiet tal-prostata ventrali, in-nuffata seminali, il-muskolu reffiegh bulbukavernosu ani plus, il-glandoli ta' Cowper, ir-ras tal-pene, il-fwied u l-gisem u l-bidla fil-piż tal-gisem mill-bidu tad-dożagġ san-nekropsija. Id-dejta tista' tiġi ppreżentata wkoll wara aġġustament tal-kovarjanza għall-piż tal-gisem, izda din ma għandhiex tiehu post preżentazzjoni tad-dejta mhux aġġustata. Barra minn hekk, jekk fl-ebda wiehed mill-gruppi ma ssehh separazzjoni prepuzjali (PPS), l-inċidenza tal-PPS għandha tiġi rreġistrata u titqabbel b'mod statistiku mal-grupp tal-kontroll permezz tat-test Fisher Exact.

▼ **M5**

63. Fil-verifika tad-dejta mdaħħla fil-kompjuter mal-iskedi tad-dejta originali għall-preċiżjoni, il-valuri tal-piż tal-organi li mhumiex bijoloġikament plaw-zibbli jew li jvarjaw b'iktar minn tliet devjazzjonijiet standard mill-medji tal-grupp tat-trattament għandhom jiġu skrutinizzati bir-reqqa u jaf ikollhom bżonn jitwarrbu, peress li aktarx ikunu żbalji fir-reġistrazzjoni.
64. It-tqabbil tar-riżultati tal-istudju mal-valuri tas-CV tal-OECD (fit-Tabella 1) spiss ikun pass importanti fl-interpretazzjoni dwar il-validità tar-riżultati tal-istudju. Id-dejta storika għall-gruppi tal-kontroll tal-veikolu għandha tinżamm fil-laboratorju. Id-dejta storika għar-risponsi għal sustanzi kimiċi ta' referenza pożittivi, bħal TP u FT, għandha tinżamm fil-laboratorju wkoll. Il-laboratorju jistgħu jittestjaw b'mod perijodiku wkoll ir-rispons għal agonisti u antagonisti dgħajfin magħrufin tal-androġen u jzommu din id-dejta. Din id-dejta tista' titqabbel mad-dejta disponibbli tal-OECD biex jiġi żgurat li l-metodi tal-laboratorju jrendu preċiżjoni u saħħa statistiċi suffiċjenti.

▼ **M5***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET:**

Androġenika hija terminu użat biex tiġi deskritta influwenza pożittiva fuq it-tkabbir tat-tessuti li jiddependu fuq l-androġen

Antiandroġenika hija l-hila ta' sustanza kimika sabiex trazzan l-azzjoni ta' TP f'organizmu mammiferu.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

Data tat-twelid hija l-jum 0 wara t-twelid.

Doża hija l-ammont ta' sustanza kimika mogħtija. Għall-Bijoassaġġ Hershberger, id-doża tingħata bhala piż tas-sustanza kimika tat-test għal kull piż tal-ġisem ta' unità tal-annimal tat-test f'kull jum (eż. mg/kg piż tal-ġisem/jum).

Dożaġġ hija terminu ġenerali li tinvolvi d-doża, il-frekwenza tagħha u d-durata tad-dożaġġ.

Moribond hija terminu użata biex tiddekrivi annimal fi stat riesaq lejn il-mewt, jiġifieri qrib il-punt tal-mewt.

Jum X wara t-twelid huwa l-jum numru X tal-hajja wara t-twelid.

Sensitività hija l-hila ta' metodu ta' ttestjar biex jidentifika b'mod korrett sustanzi kimiċi li għandhom il-proprjetà li qed jiġu ttestjati għaliha.

Speċifiċità hija l-hila ta' metodu ta' ttestjar biex jidentifika b'mod korrett sustanzi kimiċi li ma għandhomx il-proprjetà li qed jiġu ttestjati għaliha.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Validazzjoni hija proċess xjentifiku mfassal biex jiġu karatterizzati r-rekwiziti u l-limitazzjonijiet operazzjonali ta' metodu ta' ttestjar u biex tintwera l-affidabilità u r-relevanza tiegħu għal skop partikolari.

Appendiċi 2

Nota: Dokument inhejjimis Segretarjat tal-Programmi tal-Lingji Gwida ghat-T estijiet abbaži tal-ftehim milhuq fit-Sitt Laqgħa tat-TaskForce tal-EDTA

Il-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi li Jfixxlu s-Sistema Endokrinali

Livell 1 Għażla u prijoritizzazzjoni abbaži ta' informazzjoni eżistenti	— karatteristiċi fiżiċi u kimiċi, eż., MW, reattività, volatilità, bijodegradabilità, — esponim ent uman u ambjentali eż. Volum tal-produzzjoni, rilaxx, mudelli tal-użu — periklu, eż. Deġa tossikologika disponibbli
Livell 2 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġa mekkanistika	— ER, AR, TR affinità tar-riċettur li torbot — Attivazzjoni transkrizzjonali — Aromatażi u sterojdoġenesi <i>in vitro</i> — Aċċettazzjoni mir-riettur tal-aril idrokarbonjuorbot — QSARs — High Through Put Prescreens — Funzjoni ta t-tirojde — Assaġġ VTG epatoċite fil-hut — Ohrajn (skontil-każ)
Livell 3 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġa dwar mekkaniżmi u effetti endokrinali uniċi	— Assaġġ uterotofiku (relatat mal-estrogeniku) — Assaġġ Hershberger (relatat mal-androgeniku) — Funzjoni tal-ormon mhux medjat mir-riċe vitur — Ohrajn (eż. it-tirojde) — Assaġġ VTG (vitellogenin) fil-hut (relatat mal-estrogeniku)
Livell 4 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġa dwar mekkaniżmi u effetti endokrinali multipli	— OECD 407 imsahhah (fil-punti ahharin abbaži ta' mekkaniżmi endokrinali) — assaġġi fuq l-irġiel u n-nisa fil-pubertà — assaġġi fuq raġel adult intatt — Assaġġ tal-is topatologġia gonadali fil-hut — Assaġġ tal-metamorfozi taż-żring
Livell 5 Assaġġi <i>in vitro</i> li jagħtu deġa dwar l-effetti mil- mekkaniżmi endokrinali u ohrajn	— assaġġi ġenerazzjoni-1 (imsahhah bit-TG415)¹ — assaġġi ġenerazzjoni-2 (imsahhah bit-TG416)¹ — test ta' tgharbil riproduttiv (imsahhah bit-TG421)¹ — test ikkumbinat ta' 28 jum/tgharbil riproduttiv (imsahhah bit-TG 422)¹ — Assaġġi taċ-ċiklu tal-hajja parzjali u dak shih fil-hut, l-ghasafar, l-amfibji, u l-invertebrati (tal-iżvilupp u r-riproduzzjoni) ¹ Iktar tishih potenzjali kkunsidrat permer ta' VMG

VMG mamm: Grupp ta' Mmaniġġjar tal-Validazzjoni fuq Ittestjar u Valutazzjoni tal-Mammiferi

▼ **M5****NOTI GHALL-QAFAS**

- Nota 1:* Dhul fil-livelli kollha u hruġ fil-livelli kollha huma possibbli u jiddependu fuq l-ghamla tal-htigijiet eżistenti ta' informazzjoni għal skopijiet ta' valutazzjoni tal-periklu u r-riskju.
- Nota 2:* Fil-livell 5, l-ekotossikoloġija għandha tinkludi punti aħħarin li jindikaw mekkanizmi ta' effetti avversi, u l-hsara potenzjali għall-popolazzjoni.
- Nota 3:* Meta mudell multimodali jkopri diversi mill-assaġġi tal-punt aħhari uniku, dak il-mudell jiehu post l-użu ta' dawk l-assaġġi tal-punt aħhari uniku.
- Nota 4:* Il-valutazzjoni ta' kull sustanza kimika għandha tkun imsejsa fuq bażi ta' każ b'każ, filwaqt li tittiehed f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni, filwaqt li tibqa' mfakkra l-funzjoni tal-livelli tal-qafas.
- Nota 5:* Il-qafas ma għandux jitqies li jinkludi kollox bħalissa. Fil-livelli 3, 4 u 5 jinkludi assaġġi li jew huma disponibbli jew inkella li għalihom qed issir validazzjoni. Fir-rigward ta' dawn tal-aħhar, dawn huma inkluzi b'mod provviżorju. Ladarba jiġu żviluppati u vvalidati, dawn ser jiżdiedu b'mod formali mal-qafas.
- Nota 6:* Il-livell 5 ma għandux jitqies li jinkludi testijiet definittivi biss. It-testijiet inkluzi f'dak il-livell jitqiesu li jikkontribwixxu għall-valutazzjoni ġenerali tal-periklu u r-riskji.

TAGHRIF

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10-11 ta' Marzu 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.

▼M5

- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J* 26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J* 26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.
- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: *Methods in Hormone Research*, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). *Handbook of Neurotoxicology*, volume I. New York: Humana Press, p. 38.
- (17) 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.
- (18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Parigi.
- (19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269. Ara, t-taqsim II, Il-gwida dwar id-dissezzjoni pprovduta lil-laboratorji: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/-suppl.pdf>
- (22) Korea Food and Drug Administration. Gwida b'referenza viżwali dwar il-proċedura ta' assaġġ Hershberger, inkluż filmat ta' dissezzjoni. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html
- (23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- (25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼ **M5**

- (26) 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 (ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33).
- (27) Il-kapitoli li ġejjin ta' dan l-Anness:
 - B.1 bis, Tossicità orali akuta — procedura b'doża fissa
 - B.1 tris, Tossicità orali akuta — metodu tal-klassi tossika akuta

▼ M5

B.56 STUDJU ESTIŻ TAT-TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA TA' ĠENERAZZJONI WAHDA**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Testijiet (TG) tal-OECD Nru 443 (2012). Huwa bbażat fuq il-proposta tal-Kumitat Tekniku tal- International Life Science Institute (ILSI)-Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) għal studju estiż dwar ir-riproduttività ta' ġenerazzjoni wahda fl-istadju tal-hajja F_1 kif ippubblikata f'Cooper et al., 2006 (1). Sar hafna titjib u kien hemm hafna kjarifiki fit-tifsila tal-istudju sabiex tiġi pprovduta flessibilità u sabiex tiġi enfasizzata l-importanza tal-bidu b'għarfien eżistenti, filwaqt li jintużaw osservazzjonijiet tul il-hajja biex jiġi ggwidat u jiffassal l-ittestjar. Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi deskrizzjoni dettaljata tal-kondotta operazzjonali ta' Studju Estiż tat-Tossicità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Wahda. Il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi tliet koorti ta' annimali F_1 :

Koorta 1:: valutazzjoni tal-punti ahħarin tar-riproduzzjoni/l-iżvilupp; din il-koorta tista' tiġi estiza biex tinkludi ġenerazzjoni F_2 ,

Koorta 2:: valutazzjoni tal-impatt potenzjali tal-esponiment kimiku fuq is-sistema nervuza li tkun fil-proċess ta' żvilupp,

Koorta 3:: valutazzjoni tal-impatt potenzjali tal-esponiment kimiku fuq is-sistema immuni li tkun fil-proċess ta' żvilupp.

2. Deċiżjonijiet dwar jekk tiġix iwwalutata t-tieni ġenerazzjoni u biex titneħħa koorta tan-newrotossicità tal-iżvilupp u/jew koorta tal-immunotossicità tal-iżvilupp għandhom jirriflettu għarfien eżistenti għas-sustanza kimika li tkun qed tiġi evalwata, kif ukoll il-bżonnijiet tal-bosta awtoritajiet regolatorji. L-iskop tal-metodu ta' ttestjar huwa li jipprovdi dettalji dwar kif jista' jsir l-istudju u li jindirizza kif għandha tiġi evalwata kull koorta.
3. Il-proċedura għad-deċiżjoni dwar l-iskattar intern għall-produzzjoni tat-tieni ġenerazzjoni hija deskritta fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 117 (39) għal dawk l-awtoritajiet regolatorji li jużaw skattaturi interni.

KUNSIDERAZZJONIJET U GHANIJET INIZJALI

4. L-ghan ewlieni tal-Istudju Estiż tat-Tossicità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Wahda huwa li jevalwa l-istadji tal-hajja speċifiċi mhux koperti minn tipi oħrajn ta' studji tat-tossicità u jittestja għal effetti li jistgħu jseħhu minhabba esponiment kimiku qabel u wara t-twelid. Għal punti ahħarin riproduttivi, huwa previst li, bhala l-ewwel pass u meta tkun disponibbli, tintuża informazzjoni minn studji b'doża ripetuta (inkluzi studji ta' tgħarbil dwar it-tossicità riproduttiva, eż., TG tal-OECD Nru 422 (32)), jew assaġġi ta' tgħarbil ta' interferenti endokrinali fuq terminu qasir, (eż., Assaġġ uterotofiku — metodu ta' ttestjar B.54 (36); u l-assaġġ Hershberger — metodu ta' ttestjar B.55 (37)) biex jinqabdu effetti fuq organi riproduttivi għall-irġiel u n-nisa. Dan jista' jinkludi spermatogenezi (istopatoloġija testikolari) għall-irġiel u cikli estrużi, għadd tal-follikoli/maturità tal-oociti u integrità tal-ovarji (istopatoloġija) għan-nisa. Imbagħad, l-Istudju Estiż tat-Tossicità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Wahda jservi bhala test għal punti ahħarin riproduttivi li jehtieġu l-interazzjoni ta' rġiel ma' nisa, nisa ma' conceptus, u nisa ma' ulied u l-ġenerazzjoni F_1 generation sa wara l-maturità sesswali (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151 li jsostni dan il-metodu ta' ttestjar (40)).

▼ M5

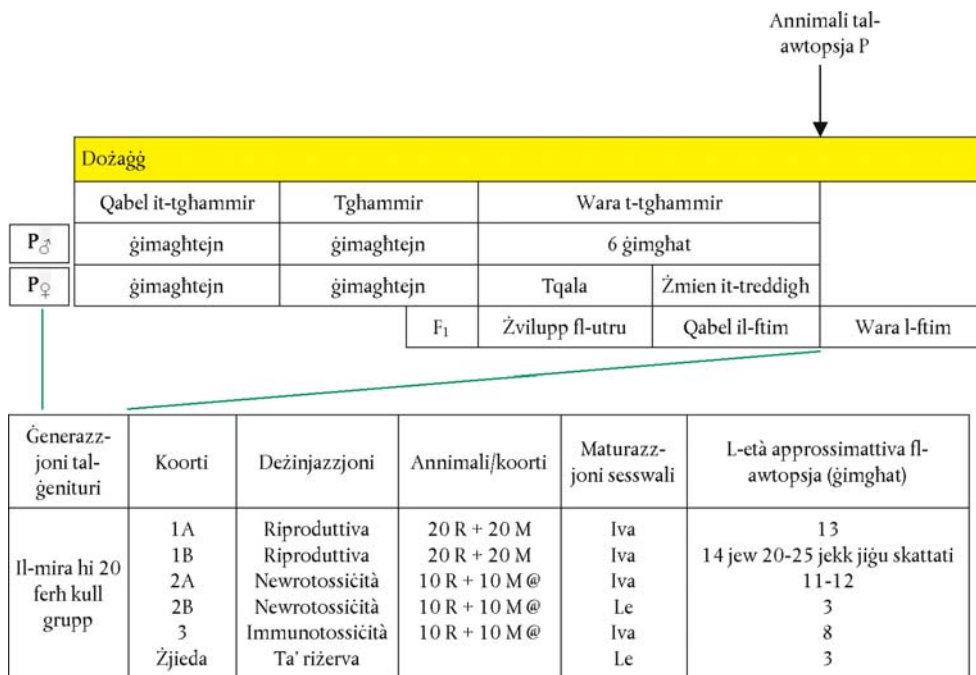
5. Il-metodu ta' ttestjar huwa mfassal sabiex jipprovdi evalwazzjoni tal-effetti ta' qabel u wara t-twelid tas-sustanzi kimiċi fuq l-iżvilupp kif ukoll evalwazzjoni dettaljata tat-tossiċità sistemika f'nisa tqal u li qed iredgħu u wlied żgħar u adulti. Analizi dettaljata tal-punti ahħarin ewlenin tal-iżvilupp, bħall-vijabbiltà tal-wild, is-saħħa ta' dawk li għadhom kif jitwieldu, l-istatus tal-iżvilupp fit-twelid, u l-iżvilupp fiziku u funzjonali sal-adulterza, hija mistennija tidentifika organi speċifiċi fil-mira fl-ulied. Barra minn hekk, l-istudju ser jipprovdi u/jew jikkonferma informazzjoni dwar l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq l-integrità u l-prestazzjoni tas-sistemi riproduttivi ta' rġiel u nisa adulti. B'mod speċifiku, iżda mhux biss, jiġu kkunsidrati l-parametri li ġejjin: il-funzjoni gonadali, iċ-ċiklu estruż, il-maturità tal-isperma epididimali, l-imġiba tat-tghammir, it-twelid, it-tqala, il-hlas, u t-treddigh. Barra minn hekk, l-informazzjoni miksuba mill-valutazzjonijiet tan-newrotossiċità tal-iżvilupp u tal-immunotossiċità tal-iżvilupp ser tikkarakterizza l-effetti potenzjali f'dawk is-sistemi. Id-dejta miksuba minn dawn it-testijiet għandha tippermetti li ssir id-determinazzjoni tal-Livelli ta' Effett Avvers Mhux Osservat (NOAELs), l-Inqas Livelli ta' Effett Avvers Osservat (LOAELs) u/jew dożi ta' riferiment għall-bosta punti ahħarin u/jew tintuża biex tikkarakterizza l-effetti misjubin fi studji preċedenti b'doża ripetuta u/jew isservi ta' gwida għat-testijiet sussegwenti.
6. Fil-Figura 1 hemm ippreżentata tpingija skematika tal-protokoll. Is-sustanza kimika tat-test tingħata kontinwament f'dożi gradwati lil bosta gruppi ta' rġiel u nisa sesswalment maturi. Din il-generazzjoni parentali (P) hija dożata għal perjodu definit qabel it-tghammir (magħżul fuq il-bażi tal-informazzjoni disponibbli tas-sustanza kimika tat-test; iżda għal tal-inqas ġimghatejn) u perjodu ta' tghammir ta' ġimghatejn. Irġiel P ikomplu jiġu kkurati tal-inqas sal-ftim tal-F₁. Għandhom jiġu kkurati għal tal-inqas 10 ġimghat. Jistgħu jiġu kkurati iktar jekk ikun hemm bżonn li jiġu ċċarati l-effetti fuq ir-riproduzzjoni. Il-kura tan-nisa P tkompli matul it-tqala u t-treddigh sat-terminazzjoni wara l-ftim tal-boton tagħhom (jiġifieri 8-10 ġimghat ta' kura). L-ulied F₁ jirċievu iktar kura bis-sustanza kimika tat-test mill-ftim sal-adulterza. Jekk tiġi vvalutata t-tieni generazzjoni (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 117 (39)), l-ulied F₁ ser jinzammu bil-kura sal-ftim tal-F₂, jew sa tmiem l-istudju.
7. Osservazzjonijiet kliniċi u eżamijiet patoloġiċi jsiru fuq l-annimali kollha għal sinjali ta' tossiċità, b'enfasi speċjali fuq l-integrità u l-prestazzjoni tas-sistemi riproduttivi ta' rġiel u nisa u s-saħħa, it-tkabbir, l-iżvilupp u l-funzjoni tal-ulied. Fil-ftim, l-ulied magħżulin jiġu assenjati f'sottogruppi speċifiċi (koorti 1-3, ara l-paragrafi 33 u 34 u l-Figura 1) għal iktar investigazzjonijiet, inklużi l-maturità sesswali, l-integrità u l-funzjoni tal-organu riproduttiv, il-punti ahħarin newroloġiċi u tal-imġiba, u l-funzjonijiet immuni.
8. Fit-twertiq tal-istudju, għandhom jiġu segwiti l-prinċipji ta' gwida u l-kunsiderazzjonijiet spjegati fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 19 dwar ir-rikonoxximent, il-valutazzjoni, u l-użu ta' sinjali kliniċi bħala punti ahħarin umanitarji għal annimali sperimentali użati fl-evalwazzjonijiet tas-sikurezza (34).

▼ M5

9. Meta jkun hemm disponibbli numru suffiċjenti ta' studji biex ikun żgurat l-impatt ta' din it-tifsila l-ġdida tal-istudju, il-metodu ta' ttestjar ser jiġi analizzat u jekk ikun hemm bżonn rivedut fid-dawl tal-esperjenzi miksubin.

Figura 1

Skema tal-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Wahda



@ wieħed għal kull ferh u li jirrappreżenta 20 ferh bħala total, meta possibbli

DESKRIZZJONIJIET TAL-METODU/PREPARAZZJONIJIET GHAT-TEST

Animali

Għażla tal-ispeċi u r-razza tal-annimali

10. L-għażla tal-ispeċi għat-test tat-tossiċità riproduttiva għandha tiġi kkunsidrata bir-reqqa fid-dawl tal-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni. Madankollu, minhabba d-dejta ta' sfond estensiva u l-komparabbiltà għat-testijiet tat-tossiċità ġenerali, normalment il-far ikun l-ispeċi preferuta, u l-kriterji u r-rakkomandazzjonijiet mogħtijin f'dan il-metodu ta' ttestjar jirreferu għal din l-ispeċi. Jekk jintużaw speċi oħrajn, għandha tingħata ġustifikazzjoni u ser ikun hemm bżonn li jsiru l-modifiki xierqa. Ma għandhomx jintużaw razez b'fekondità baxxa jew inċidenza għolja magħrufa sew ta' difetti spontanji fl-izvilupp.

L-eżet, il-piż tal-ġisem u l-kriterji ta' inkluzjoni

11. Għandhom jintużaw annimali parentali b'saħħithom li ma kinux soġġetti għal proċeduri sperimentali fl-imghoddi. Kemm l-irġiel kif ukoll in-nisa għandhom ikunu studjati u n-nisa għandhom ikunu qatt ma welldu u mhux tqal. L-annimali P għandhom ikunu laħqu l-maturità sesswali, ta' piż simili (daww tal-istess sess) fil-bidu tad-dożaġġ, eżet simili (madwar 90 jum) fit-tghammir, u jirrappreżentaw l-ispeċi u r-razza fl-istudju. L-annimali għandhom jiġu akklimatizzati għal tal-inqas 5 ijiem wara li jaslu. L-annimali jittqassmu b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u kura, b'tali mod li jirriżulta f'valuri medji komparabbli tal-piż tal-ġisem bejn il-gruppi (jiġifieri ± 20 % tal-medja).

▼ M5

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-ghalf

12. It-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperiment għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). L-umdità relattiva għandha tkun bejn 30-70 %, b'medda ideali ta' 50–60 %. Id-dawl artifiċjali għandu jitfassal għal 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista illimitata ta' ilma tajjeb għax-xorb. Għandha tingħata attenzjoni bir-reqqa għall-kontenut ta' fitoestrogen tad-dietta, peress li livell għoli ta' fitoestrogen fid-dietta jista' jaffettwa xi punti aħharin tar-riproduzzjoni. Huma rakkomandati dieti standaradizzati b'formula miftuħa li fihom tnaqqsu s-sustanzi kimiċi estrogeniċi (2)(30). L-ghazla tad-dietta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata tahlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata b'dan il-metodu. Il-kontenut, l-omoġenità u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fid-dietti għandhom jiġu verifikati. L-ghalf u l-ilma tajjeb għax-xorb għandhom jiġu analizzati b'mod regolari għal kontaminanti. Il-kampjuni ta' kull lott tad-dietta użata matul l-istudju għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet xierqa (eż., iffriżati f'– 20 °C), sakemm jiġi finalizzat ir-rapport, f'każ li r-riżultati jehtiegu iktar analiżi tal-ingredjenti tad-dietta.
13. L-annimali għandhom jitqieghdu f'gagēg f' gruppi żgħar tal-istess sess u grupp tal-kura. Jistgħu jitqieghdu f'gagga b'mod individwali biex jiġu evitati korrimenti possibbli (eż., irġiel wara l-perjodu ta' tghammir). Il-proċeduri ta' tghammir għandhom isiru f'gagēg xierqa. Wara evidenza ta' kopulazzjoni, in-nisa li huma supponuti tqal jitqieghdu f'gagēg separati għall-hlas jew il-maternità fejn ikunu pprovduti b'materjali xierqa u definiti tat-tibjit. Il-boton jitqieghdu ma' ommhom sal-ftim. Annimali F₁ għandhom jitqieghdu f' gruppi żgħar tal-istess sess u grupp tal-kura mill-ftim sat-tmiem. Jekk dan ikun xjentifikament ġustifikat, l-annimali jistgħu jitqieghdu f'gagga b'mod individwali. Il-livell ta' fitoestrogeni li jinsab fil-materjal tat-tibjit magħżul għandu jkun minimu =.

Numru u identifikazzjoni tal-annimali

14. Is-soltu, kull test u grupp ta' kontroll għandu jkun fih numru suffiċjenti ta' pari tat-tghammir biex tal-inqas ikun hemm 20 mara tqila f'kull grupp tad-doża. L-ghan huwa li jiġu prodotti biżżejjed nisa tqal halli tkun żgurata evalwazzjoni valida tal-potenzjal tas-sustanza kimika sabiex taffettwa l-fertilità, it-tqala u l-imġiba materna tal-ġenerazzjoni P u t-tkabbir u l-iżvilupp tal-ulied F₁, mit-twelid sal-maturità. Nuqqas ta' kisba tan-numru mixtieq ta' annimali tqal mhux bilfors jinvalida l-istudju u għandu jiġi evalwat fuq bażi ta' każ b'każ, filwaqt li tiġi kkunsidrata relazzjoni kawżali possibbli mas-sustanza kimika tat-test.
15. Kull annimal P jiġi assenjat numru uniku ta' identifikazzjoni qabel jibda d-dożagġ. Jekk id-dejta storika tal-laboratorju tissuggerixxi li sehem importanti ta' nisa jistgħu ma jurux ċikli estrużi regolari (4 jew 5 ijiem), huwa rakkomandat li ssir valutazzjoni taċ-ċikli estrużi qabel tibda l-kura. Inkella, id-daqs tal-grupp jista' jiżdied biex jiġi żgurat li tal-inqas 20 mara f'kull grupp ikollha ċikli estrużi regolari (4 jew 5 ijiem) fil-bidu tal-kura. L-ulied F₁ kollha jiġu identifikati b'mod uniku meta jiġu eżaminati għall-ewwel darba dawk li jkunu għadhom kif twieldu fil-jum ta' wara t-twelid (PND) 0 jew 1. Ir-reġistrazzjonijiet li jindikaw il-boton ta' origini għandhom jinżammu għall-annimali F₁, u F₂ kollha fejn applikabbli, matul l-istudju kollu.

▼ **M5****Is-sustanza kimika tat-test***L-informazzjoni disponibbli dwar is-sustanza kimika tat-test*

16. L-analiżi tal-informazzjoni eżistenti hija importanti għal deċiżjonijiet dwar ir-rotta tal-amministrazzjoni, l-għażla tal-veikolu, l-għażla tal-ispeċi tal-annimali, l-għażla tad-dożaġġi u l-modifiki potenzjali tal-iskeda tad-dożaġġ. Għaldaqstant, l-informazzjoni kollha li hemm għad-dispożizzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test, jiġifieri proprjetajiet fizikokimici, tossikokinetiċi (inkluż metabolizmu speċifiku għall-ispeċi), tossikodinamiċi, relazzjonijiet bejn l-istruttura u l-attività (SARs), proċessi metabolici *in vitro*, riżultati ta' studji preċedenti dwar it-tossiċità u informazzjoni rilevanti dwar analogi strutturali għandhom jittiehdu f'kunsiderazzjoni fl-ippjanar tal-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Generazzjoni Wahda. Informazzjoni preliminari dwar l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metabolizmu u l-eliminazzjoni (ADME) u l-bijoakkumulazzjoni tista' tinkiseb mill-istruttura kimika, id-dejta fizikokimika, il-firxa ta' proteina tal-plażma li tghaqqad jew studji tossikokinetiċi (TK), filwaqt li r-riżultati minn studji tat-tossiċità jagħtu informazzjoni addizzjonali, eż., dwar in-NOAEL, il-metabolizmu jew l-induzzjoni tal-metabolizmu.

Kunsiderazzjoni tad-dejta tossikokinetika

17. Għad li mhijiex meħtieġa, dejta dwar it-TK minn studji li saru fl-imghotti ta' sejbien tal-medda tad-doża jew ohrajn huma ferm utli fl-ippjanar tat-tifsila tal-istudju, l-għażla tal-livelli tad-doża u l-interpretazzjoni tar-riżultati. Hija partikolarment utli dejta li: 1) tivverifika l-esponiment ta' feti u frieh li qed jiżviluppaw għas-sustanza kimika tat-test (jew metaboliti rilevanti), 2) tipprovdi stima tad-dożimentrija interna, u 3) tevalwa għal saturazzjoni potenzjali li tiddependi fuq id-doża tal-proċessi kinetiċi. Dejta addizzjonali dwar it-TK, bħal profili tal-metaboliti, korsijiet tal-hin ta' konċentrazzjoni, eċċ. għandha tiġi kkunsidrata wkoll jekk tkun disponibbli. Dejta supplimentari dwar it-TK tista' tingabar ukoll matul l-istudju ewlieni, diment li ma xxekeklix il-għbir u l-interpretazzjoni tal-punti ahħarin ewlenin tal-istudju.

Bhala gwida ġenerali, is-sett ta' dejta li ġej dwar it-TK ikun utli fl-ippjanar tal-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Generazzjoni Wahda:

— Tqala tard (eż., Jum tat-Tqala 20) — demm matern u demm tal-fetu,

— Nofs it-treddigh (PND 10) — demm matern, demm tal-ferh u/jew halib,

— Ftit wara l-ftim (eż., PND 28) — kampjuni tad-demm tal-annimal li nfatam.

Għandu jkun hemm flessibilità fid-determinazzjoni tal-analiti speċifiċi (eż. sustanza kimika u/jew metaboliti tal-ġenitur) u l-iskema tal-kampjunar. Pereżempju, in-numru u l-puntwalità tal-għbir tal-kampjun f'jum partikolari tal-kampjunar ser ikunu jiddependu fuq ir-rotta ta' esponiment u l-għarfien minn qabel dwar il-proprjetajiet tat-TK f'annimali mhux tqal. Għal studji djetetiċi, il-kampjunar f'hin konsistenti wiehed f'kull wiehed minn dawn il-jiem huwa biżżejjed, filwaqt li d-dożaġġ b'gavage jista' jkun jeħtieġ hinijiet traddizzjonali ta' kampjunar biex tinkiseb stima aħjar tal-medda ta' dozi interni. Madankollu, m'hemmx bżonn li jiġi ġġenerat perjodu ta' żmien b'konċentrazzjoni shiħa f'xi wiehed mill-jiem tal-kampjun. Jekk ikun hemm bżonn, id-demm jista' jingabar skont is-sess fi hdan il-boton għal analiżijiet tal-fetu u tal-annimali li għadhom kif twieldu.

▼M5

Rotta tal-amministrazzjoni

18. L-ghażla tar-rotta għandha tiehu f'kunsiderazzjoni l-iktar rotta/rotot rilevanti għall-esponiment tal-bniedem. Għad li l-protokoll huwa mfassal għall-ghoti tas-sustanza kimika tat-test permzz tad-dieta, jista' jiġi modifikat biex din tingħata b'rotot oħrajn (ilma tajjeb għax-xorb, gavage, tehid man-nifs, dermali), skont il-karatteristiċi tas-sustanza kimika u l-informazzjoni meħtieġa.

Ghażla tal-veikolu

19. Meta jkun hemm bżonn, is-sustanza kimika tat-test tinħall jew tiġi sospiża f'veikolu xieraq. Huwa rakkomandat li, meta dan ikun possibbli, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' soluzzjoni/sospensjoni milwiema, segwit minn kunsiderazzjoni ta' soluzzjoni/sospensjoni fiż-żejt (eż., żejt tal-qamħirrun). Għal veikolu li mhumiex ilma, għandhom ikunu magħrufin il-karatteristiċi tossiċi tal-veikolu. L-użu ta' veikoli b'tossiċità intrinsika potenzjali għandu jiġi evitat (eż., aċetun, DMSO). Għandha tiġi ddeterminata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fil-veikolu. Għandhom jittiehdu f'kunsiderazzjoni l-karatteristiċi li ġejjin jekk jintuża veikolu jew addittiv ieħor biex jithaffef id-dożaġġ: effetti fuq l-assorbiment, id-distribuzzjoni, il-metaboliżmu jew iż-żamma tas-sustanza kimika tat-test; effetti fuq il-proprietajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test li jistgħu jibdlu l-karatteristiċi tossiċi tagħha; u effetti fuq il-konsum ta' ilma jew ikel jew l-istatus nutrizzjonali tal-annimali.

Ghażla tad-doża

20. Normalment, l-istudju għandu jinkludi tal-inqas tliet livelli tad-doża u kontrolli konkurrenti. Meta jingħazlu livelli xierqa tad-doża, l-investigatur għandu jqis l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni, inkluża informazzjoni dwar id-dożaġġ minn studji li saru qabel, dejta dwar it-TK minn annimali tqal jew mhux tqal, kemm isehh trasferiment fit-treddigh, u stimuli tal-esponiment tal-bniedem. Jekk hemm dejta dwar it-TK disponibbli li tindika saturazzjoni li tiddependi fuq id-doża tal-proċessi tat-TK, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġu evitati livelli tad-doża għoljin li jesibixxu b'mod ċar saturazzjoni, diment li ovvjament l-esponimenti tal-bniedem ikunu mistennjin ikunu f'livell ferm inqas mill-punt ta' saturazzjoni. F'dawn il-kazijiet, l-ogħla livell tad-doża għandu jkun il-punt ta' inflezzjoni, jew f'it ogħla minnu, għat-tranżizzjoni lejn imġiba mhux lineari tat-TK.
21. Fin-nuqqas ta' dejta rilevanti dwar it-TK, il-livelli tad-doża għandhom ikunu bbażati fuq effetti tossiċi, sakemm ma jkunux limitati mill-ghamla fiżika/kimika tas-sustanza kimika tat-test. Jekk il-livelli tad-doża jkun bbażati fuq it-tossiċità, l-ogħla doża għandha tingħazel bl-ghan li tikka-guna xi tossiċità sistemika, iżda mhux mewt jew tbatija severa tal-annimali.
22. Għandha tingħazel sekwenza dixxendenti tal-livelli tad-doża sabiex jintwera kwalunkwe effett relatat mad-doża u sabiex jiġu stabbiliti NOAELs jew dozi qrib il-limitu ta' identifikazzjoni li jippermetti sabiex tiġi derivata doża ta' riferiment għall-iktar punt(i) aħhari(n) sensitiv(i). Biex jiġi evitat spazju kbir bejn id-dożi tal-NOAELs u l-LOAELs, spiss intervalli doppju jew erba' darbiet ta' xulxin ikunu ottimali. Iz-żieda tar-raba' grupp tat-test spiss ikun ippreferut milli jintuża intervall kbir hafna (eż., fattur ta' iktar minn 10) bejn id-dozi.
23. Hlief għall-kura bis-sustanza kimika tat-test, l-annimali fil-grupp ta' kontroll jiġu ttrattati bl-istess mod bħas-sugġetti tal-grupp tat-test. Dan il-grupp ma għandux jingħata kura jew kura finta jew grupp ta' kontroll b'veikolu jekk jintuża veikolu fl-ghoti tas-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża veikolu, il-grupp ta' kontroll għandu jirċievi l-veikolu fl-ogħla volum użat.

▼ M5

Test tal-limitu

24. Jekk ma hemm ebda evidenza ta' tossiċità b'doża ta' tal-inqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum fi studji b'doża ripetuta, jew jekk ma tkunx mistennija tossiċità fuq il-bażi ta' dejta minn sustanzi kimiċi relatati fil-livell strutturali u/jew metaboliku, li jindikaw similarità fil-proprjetajiet metabolici *in vivo/in vitro*, jista' ma jkunx hemm bżonn ta' studju li juża bosta livelli ta' doża. F'dawn il-kazijiet, l-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Generazzjoni Wahda jista' jsir billi jintuża grupp ta' kontroll u doża wahda ta' tal-inqas 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Madankollu, jekk tinsab evidenza għal tossiċità riproduttiva jew tal-iżvilupp f'din id-doża ta' limitu, ser ikun hemm bżonn ta' studji b'livelli inqas tad-doża biex jiġi identifikat NOAEL. Dawn il-kunsiderazzjonijiet tat-test ta' limitu japplikaw biss meta l-esponiment tal-bniedem ma jkunx jindika l-bżonn ta' livell ta' doża oghla.

PROCEDURI

Esponiment tal-ulied

25. L-esponiment djetetiku huwa l-metodu ppreferut tal-ghoti. Jekk isiru studji b'gavage, ta' min jinnota li l-frieh normalment jirċievu s-sustanza kimika tat-test b'mod indirett mill-ħalib biss, sakemm jibda d-dożaġġ dirett tagħhom fil-ftim. Fi studji dwar id-dieta jew l-ilma tajjeb għax-xorb, il-frieh jirċievu wkoll is-sustanza kimika tat-test direttament meta jibdwu jieklu waħedhom matul l-aħħar ġimgħa tal-perjodu tat-treddigh Għandhom jiġu kkunsidrati modifiki fit-tifsila tal-istudju meta l-eskrezzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-ħalib tkun batuta u meta jkun hemm nuqqas ta' evidenza għal esponiment kontinwu tal-ulied. F'dawn il-kazijiet, għandu jiġi kkunsidrat dożaġġ dirett tal-frieh matul il-perjodu tat-treddigh fuq il-bażi tal-informazzjoni disponibbli dwar it-TK, it-tossiċità tal-ulied jew bidliet fil-bijomarkaturi (3)(4). Għandhom jingħataw kunsiderazzjoni attenta l-benefiċċji u l-iżvantaġġi qabel ma jsiru studji tad-dożaġġ dirett fuq frieh li għadhom fil-fażi tat-treddigh (5).

Skeda tad-dożaġġ u għoti tad-doži

26. Jista' jkun hemm disponibbli ċerta informazzjoni dwar iċ-ċikli estrużi, l-istopatoloġija tal-apparat riproduttiv tal-irġiel u n-nisa u analiżi tal-isperma epididimali/testikolari minn studji li saru fl-imghoddi dwar it-tossiċità b'doża ripetuta ta' durata adegwata. Għalhekk, id-durata tal-kura qabel it-tgħammir fl-Istudju Estiż tat-Tossiċità Riproduttiva ta' Generazzjoni Wahda hija mfassla sabiex tidentifika l-effetti fuq bidliet funzjonali li jistgħu jinterferixxu mal-imġiba tat-tgħammir u l-fertilizzazzjoni. Il-kura ta' qabel it-tgħammir għandha tkun twila biżżejjed biex jinkisbu kundizzjonijiet ta' esponiment bi stat kostanti fl-irġiel u n-nisa P. F'hafna mill-kazijiet, kura ta' qabel it-tgħammir ta' ġimgħatejn għaż-żewġ sessi titqies li hija adegwata. Għan-nisa, din tkopri 3-4 ċikli estrużi shaħ u għandha tkun biżżejjed biex taqbad kwalunkwe effett avvers fuq iċ-ċikliċità. Għall-irġiel, din hija ekwivalenti għaż-zmien meħtieġ għal tranzitu epididimali tal-ispermatozoa li qed timmatura u għandha tippermetti li jiġu identifikati l-effetti posttestikolari fuq l-isperma (matul l-aħħar stadji tal-ispermjazzjoni u l-maturità tal-isperma epididimali) fit-tgħammir. Fil-hin tat-terminazzjoni, meta jkun skedati istopatoloġija testikolari u epididimali u analiżi tal-parametri tal-isperma, l-irġiel P u F₁ ser ikunu ġew esposti għal tal-inqas proċess spermatogeniku wieħed shih ((6)(7)(8)(9) u d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151(40)).

▼ M5

27. Ix-xenarji ta' esponiment ta' qabel it-tghammir għall-irġiel jistgħu jiġu adattati jekk fl-istudju preċedenti jkunu ġew oidentifikati b'mod ċar tossiċità testikolari (indeboliment tal-ispermatogenezi) jew effetti fuq l-integrità u l-funzjoni tal-isperma. B'mod simili, għan-nisa, l-effetti magħrufin tas-sustanza kimika tat-test fuq iċ-ċiklu estruż u b'hekk anki r-riċettività sesswali, jistgħu jiġġustifikaw xenarji ta' esponiment ta' qabel it-tghammir differenti. F'kazijiet speċjali, jista' jkun aċċettabbli li kura tan-nisa P tinbeda biss wara li jkun inkiseb kampjun pożittiv għall-isperma (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151(40)).
28. Ladarba jiġi stabbilit il-perjodu ta' dożaġġ ta' qabel it-tghammir, l-annimali għandhom jirċievu s-sustanza kimika tat-test kontinwament fuq bażi ta' 7 ijiem/ġimgħa san-nekropsija. L-annimali kollha għandhom jingħataw id-doża bl-istess metodu. Id-dożaġġ għandu jkompli matul il-perjodu ta' tghammir ta' ġimgħatejn u, għan-nisa P, matul it-tqala u t-treddigh sal-jum tat-terminazzjoni tal-annimal miftum. L-irġiel għandhom jiġu kkurati bl-istess mod sat-terminazzjoni fiż-żmien meta l-annimali F₁ jinfatmu. Għan-nekropsija, għandha tingħata prijorità lil nisa li għandhom jiġu nekropsjati fuq numru ikbar ta' jiem, skont il-facilitajiet tal-laboratorju. Sakemm ma jkunx diġà nbeda matul il-perjodu tat-treddigh, dożaġġ dirett tal-irġiel u n-nisa F₁ magħżulin għandu jinbeda fil-ftim u jkompli san-nekropsija skedata, skont l-assenjament tal-koorti.
29. Għal sustanzi kimiċi mogħtijin permezz tad-dieta jew ilma tajjeb għax-xorb, importanti li jiġi żgurat li l-kwantitajiet tas-sustanza kimika tat-test involuti ma jxekkklux in-nutrizzjoni jew il-bilanċ tal-ilma normali. Meta s-sustanza kimika tat-test tingħata fid-dieta, jistgħu jithaddmu jew konċentrazzjoni djetetika kostanti (ppm) jew livell ta' doża kostanti f'termini tal-piż tal-ġisem tal-annimal; l-għażla li ssir għandha tiġi speċifikata.
30. Meta s-sustanza kimika tat-test tingħata b'gavage, il-volum ta' likwidu mogħti f'darba normalment ma għandux jaqbeż il-1 ml/100 g piż tal-ġisem (0,4 ml/100 g piż tal-ġisem huwa l-massimu għaž-żejt, eż., żejt tal-qamhirrun). Hlief għal sustanzi kimiċi irritanti jew korrożivi, li normalment juru effetti aggravat f'koncentrazzjonijiet oghla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-koncentrazzjoni biex jiġi żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża. Il-kura għandha tingħata f'hinijiet simili ta' kull ġurnata. Normalment id-doża lil kull annimal għandha tkun ibbażata fuq l-iktar determinazzjoni riċenti tal-piż tal-ġisem individwali u tiġi aġġustata tal-inqas kull ġimgħa fl-irġiel adulti u n-nisa adulti mhux tqal, u kull jumejn f'nisa tqal u annimali F₁ meta tingħata qabel il-ftim u matul il-ġimgħatejn ta' wara l-ftim. Jekk id-dejta dwar it-TK tindika trasferiment baxx tal-plaċenta tas-sustanza kimika tat-test, id-doża b'gavage matul l-ahħar ġimgħa tat-tqala jista' jkollha bżonn tiġi aġġustata biex jiġi evitat għoti ta' doża tossika wisq lill-omm. In-nisa ma għandhomx jiġu kkurati b'gavage, jew xi rotta oħra tal-kura meta l-annimal ikun jeħtieġ li jitqandel, dakinhar tal-hlas; omissjoni tal-għoti tas-sustanza kimika tat-test dakinhar hija ppreferuta milli tfixkil tal-proċess tat-twelid.

▼ M5

Tghammir

31. Kull mara P ghandha titqghed ma' raġel waħdu magħżul b'mod aleatorju u mhux relatat mill-istess grupp tad-dożaġġ (tlaqqiġ 1:1) sakemm tiġi osservata evidenza ta' kopulazzjoni jew wara li jghaddu ġimghatejn. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed irġiel, pereżempju minhabba mewt ta' rġiel qabel it-tlaqqiġ, ir-raġel/l-irġiel li diġà tghammru jistgħu jitlaqqgħu (1:1) mat-tieni mara/nisa b'tali mod li n-nisa kollha jkun tlaqqgħu ma' raġel. Il-jum 0 tat-tqala huwa definit b'ħala l-jum li fih tiġi kkonfermata evidenza ta' tghammir (jinstabu l-plakka vaginali jew sperma). L-annimali għandhom jiġu separati malajr kemm jista' jkun wara li tiġi osservata evidenza ta' kopulazzjoni. Jekk ma jkunx seħh tghammir wara ġimghatejn, l-annimali għandhom jiġu separati minghajr ebda opportunità oħra ta' tghammir. Il-pari li jitghammru għandhom ikunu identifikati b'mod ċar fid-dejta.

Daqs tal-boton

32. Fil-jum 4 wara t-twelid, id-daqs ta' kull boton jista' jiġi aġġustat billi jiġu eliminati l-frieh żejda permezz ta' għażla aleatorja b'tali mod li jirrizultaw, kemm jista' jkun, hamest irġiel u hames nisa għal kull boton. L-eliminazzjoni selettiva tal-frieh, eż., fuq il-bażi tal-piż tal-ġisem, mhijiex xierqa. Mull meta n-numru ta' frieh irġiel jew nisa jipprevjeni milli jkun hemm hamsa minn kull sess għal kull boton, huwa aċċettabbli li jsir aġġustament parzjali (pereżempju, sitt irġiel u erba' nisa).

L-għażla tal-frieh għall-istudji ta' wara l-ftim (ara l-Figura 1)

33. Fil-ftim (madwar PND 21), jingħazlu frieh mill-boton kollha għad-dispożizzjoni sa 20 għal kull doża u grupp ta' kontroll biex isiru iktar eżamijiet u dawn jinżammu sal-maturità sesswali (sakemm ma jkunx hemm bżonn li jsiru testijiet qabel). Il-frieh jingħazlu b'mod aleatorju, bl-eċċezzjoni li annimali mhux żviluppati (dawk b'piż tal-ġisem f'livell iktar minn żewġ devjazzjonijiet standard inqas mill-piż medju tal-frieh tal-boton rispettiv) ma għandhomx ikunu inkluzi, peress li huwa improbabbli li ser ikunu jirrappreżentaw il-grupp tal-kura.

Fil-PND 21, il-frieh F₁ magħżulin jiġu assenjati b'mod aleatorju f'wahda mit-tliet koorti tal-annimali, kif ġej:

Koorta 1 (1 A u 1B) = = Ittestjar tat-tossicità riproduttiva/tal-iżvilupp,

Koorta 2 (2 A u 2B) = = Ittestjar tan-newrotossicità tal-iżvilupp,

Koorta 3 = = Ittestjar tan-immunotossicità tal-iżvilupp.

Koorta 1 A:: Raġel wiehed u mara/boton/grupp 1 (20/sess/grupp): għażla ta' prijorità għal valutazzjoni primarja tal-effetti fuq is-sistemi riproduttivi u tat-tossicità ġenerali.

Koorta 1B:: Raġel wiehed u mara/boton/grupp 1 (20/sess/grupp): għażla ta' prijorità għal valutazzjoni ta' segwitu tal-prestazzjoni riproduttiva permezz ta' tghammir ta' annimali F₁, meta jiġu vvalutati (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 117(39)), u għall-kisba ta' dejta addizzjonali dwar l-istopatoloġija f'kazijiet ta' tossikanti riproduttivi jew endokrinali suspettati, jew meta r-rizulati mill-koorta 1 A jfixklu.

Koorta 2 A:: Total ta' 20 ferh għal kull grupp (10 irġiel u 10 nisa għal kull grupp; raġel wiehed jew mara wahda għal kull boton) assenjati għal ittestjar tan-newromġiba segwit minn valutazzjoni tan-newroistopatoloġija b'ħala adulti.

Koorta 2B:: Total ta' 20 ferh għal kull grupp (10 irġiel u 10 nisa għal kull grupp; raġel wiehed jew mara wahda għal kull boton) assenjati għal valutazzjoni tan-newroistopatoloġija fil-ftim (PND 21 jew PND 22). Jekk ma jkunx hemm biżżejjed annimali, għandha tingħata preferenza l-assenjazzjoni tal-annimali fil-Koorta 2 A.

▼ **M5**

Koorta 3:: Total ta' 20 ferh għal kull grupp (10 irġiel u 10 nisa għal kull grupp; wiehed/wahda għal kull boton, fejn possibbli). Jista' jkun hemm bżonn ta' frieh addizzjonali mill-grupp tal-kontroll biex jaġixxu bħala annimali tal-kontroll pożittiv fl-assaġġ tar-rispons tal-antikorpi dipendenti fuq iċ-ċellola T (TDAR) fil-PND 56 ± 3.

34. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed frieh f'boton biex iservu l-koorti kollha, il-koorta 1 tiegħu preċedenza, peress li tista' tkun estiża halli tipproduċi ġenerazzjoni F₂. Jistgħu jiġu assenjati frieh addizzjonali fi kwalunkwe wahda mill-koorti f'każ ta' thassib speċifiku, eż., jekk sustanza kimika tkun suspettata li hija newrotossikant jew tossikant riproduttiv. Dawn il-frieh jistgħu jintużaw għal eżamijiet f'punti ta' zmien differenti jew għall-evalwazzjoni ta' punti aħharin supplementari. Il-frieh li ma jiġux assenjati f'koorti ser jiġu sottomessi għall-bijokimika klinika (paragrafu 55) u nekropsija grossa (paragrafu 68).

It-tieni tghammir tal-annimali P

35. Normalment it-tieni tghammir ma jkunx rakkomandat għall-annimali P, peress li jekk isehh tintilef informazzjoni importanti fuq in-numru ta' siti ta' impjant (u b'hekk dejta ta' telf wara l-impjant u perinatali, indikaturi ta' potenzjal teratoġeniku possibbli) għall-ewwel boton. Il-bżonn li jiġi verifikat jew evidenzjat effett f'nisa esposti jiġi ssodisfat ahjar billi l-istudju jiġi estiż halli jinkludi tghammir tal-ġenerazzjoni F₁. Madankollu, it-tieni tghammir tal-irġiel P ma' nisa mhux ikkurati dejjem huwa possibbiltà halli sejbiet ekwivoċi jiġu ċċarati jew għall-karatterizzazzjoni ulterjuri tal-effetti fuq il-fertilità osservati fl-ewwel tghammir.

OSSERVAZZJONIJIET FIL-HAJJA

Osservazzjonijiet kliniċi

36. Għall-annimali P u daww F₁ magħżulin, issir osservazzjoni klinika ġenerali darba kull jum. Fil-każ ta' dożaġġ b'gavage, it-twaqqit tal-osservazzjonijiet kliniċi għandu jkun qabel u wara d-dożaġġ (għal sinjali possibbli ta' tossiċità assoċjata mal-quċċata tal-konċentrazzjoni tal-plazma). Bidliet pertinenti fl-imġiba, sinjali ta' hlas diffiċli jew imtawwal u s-sinjali kollha ta' tossiċità huma rreġistrati. Darbtejn kuljum, u fi tmiem il-ġimgħa darba kuljum, l-annimali kollha jiġu osservati għal tossiċità severa, morbidità u mortalità.
37. Barra minn hekk, isir eżami iktar dettaljat tal-annimali P u F₁ kollha (wara l-ftim) fuq bazi ta' kull ġimgħa u għal konvenjenza dan jista' jsir meta l-annimal jintiżen, b'tali mod li jitnaqqas l-istess marbut mat-tqandil. L-osservazzjonijiet għandhom isiru bir-reġġa u jiġu rreġistrati billi jintużaw sistemi ta' punteġġ li ġew definti mil-laboratorju ta' ttestjar. Għandhom isiru sforzi biex jiġi żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet tat-test huma minimi. Is-sinjali osservati għandhom jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, bidliet fil-ġilda, il-pil, l-ghajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u attività awtonomika (eż., dmugh, piloerez-zjoni, daqs tal-habba, xejra respiratorja mhux tas-soltu). Bidliet fil-mixja, il-pożizzjoni, ir-rispons għat-tqandil, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, sterotipija (eż., traqqim eċċessiv, dawran ripetittiv) jew imġiba stramba (eż., awtomutilazzjoni, mixi lura) għandhom jiġu rreġistrati wkoll.

▼ **M5****Piż tal-ġisem u konsum ta' ikel/ilma**

38. L-annimali P jintiżnu fl-ewwel jum tad-dożagġ u tal-inqas kull ġimgha minn hemm 'il quddiem. Barra minn hekk, nisa P jintiżnu matul it-treddigh fl-istess jiem bħall-użin tal-frieh fil-boton tagħhom (ara l-paragrafu 44). L-annimali F₁ kollha jintiżnu għalihom fil-ftim (PND 21) u tal-inqas darba fil-ġimgha minn hemm 'il quddiem. Il-piż tal-ġisem jiġi rreġistrat ukoll dakinhar li jilhq u l-pubertà (issehħ is-separazzjoni prepuzjali jew il-patenza vaġinali). L-annimali kollha jintiżnu fis-sagrifiċċju.
39. Matul l-istudju, il-konsum ta' ikel u ilma (fil-każ ta' għoti tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma tajjeb għax-xorb) huma rreġistrati tal-inqas darba fil-ġimgha fl-istess jiem bħala piżijiet tal-ġisem tal-annimal (hlief matul il-koabitazzjoni). Il-konsum ta' ikel ta' kull gaġġa ta' annimali F₁ huwa rreġistrat kull ġimgha b'bidu mill-ghazla f'koorta rispettiva.

Ċikli estrużi

40. Informazzjoni preliminari dwar l-effetti relatati mas-sustanza kimika tat-test fuq iċ-ċiklu estruż jaf diġà tkun disponibbli minn studji preċedenti dwar it-tossicità b'doża ripetuta, u tista' tintuża fit-tfassil ta' protokoll speċifiku għas-sustanza kimika tat-test għall-Istudju Estiż tat-Tossicità Riproduttiva ta' Generazzjoni Wahda. Normalment, il-valutazzjoni taċ-ċikličità estruża (permezz ta' ċitologija vaġinali) ser tibda fil-bidu tal-perjodu tal-kura sal-konferma ta' tghammir jew fi tmiem il-perjodu ta' tghammir ta' ġimghatejn. Jekk in-nisa tgharblu għal ċikli estrużi normali qabel il-kura, ikun utli li jkomplu jittiehdu kampjuni hekk kif tinbeda l-kura, iżda jekk ikun hemm thassib dwar effetti mhux speċifiċi fil-bidu tal-kura (bħal tnaqqis inizjali ċar fil-konsum ta' ikel), f'dak il-każ l-annimali jistgħu jithallew jadattaw għall-kura sa ġimghatejn qabel il-bidu tal-perjodu ta' kampjunar ta' ġimghatejn li jwassal għat-tghammir. Jekk il-perjodu ta' kura tan-nisa jiġi estiż b'dan il-mod (jiġifieri kura ta' qabel it-tghammir għal 4 ġimghat), f'dak il-każ għandhom jittiehdu f'kunsiderazzjoni x-xiri ta' annimali iżgħar u l-estensjoni tal-perjodu tal-kura fuq l-irġiel qabel it-tlaqqiġ. Meta jinkisbu ċelloli vaġinali/ċervikali, għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata disturbanza tal-mukoża u mbagħad, l-induzzjoni tal-pseudotqala (10)(11).
41. Il-kampjuni meħudin mill-vaġina għandhom jiġu eżaminati kuljum għan-nisa F₁ kollha fil-koorta 1 A, wara l-bidu tal-patenza vaġinali, sakemm jiġi rreġistrat l-ewwel kampjun keratinizzat, sabiex jiġi ddeterminat l-intervall taz-żmien bejn iż-żewġ avvenimenti. Iċ-ċikli estrużi għan-nisa F₁ kollha fil-koorta 1 A għandu jiġi ssorveljat ukoll għal perjodu ta' ġimghatejn, b'bidu minn madwar il-PND 75. Barra minn hekk, jekk ikun hemm bżonn li jsir tghammir tal-ġenerazzjoni F₁, iċ-ċitologija vaġinali fil-koorta 1B ser tkun segwita minn żmien it-tlaqqiġ sakemm tinstab evidenza ta' tghammir.

Tghammir u tqala

42. Minbarra l-punti aħharin standard (eż., piż tal-ġisem, konsum ta' ikel, osservazzjonijiet kliniċi inklużi verifiki tal-mortalità/morbidità), jiġu rreġistrati d-dati tat-tghammir, id-data ta' inseminazzjoni u d-data tal-hlas u jiġu kkalkolati l-intervall ta' qabel l-att sesswali (tlaqqiġ sal-inseminazzjoni) u d-durata tat-tqala (inseminazzjoni sal-hlas). In-nisa P għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa fi żmien il-hlas mistenni għal kwalunkwe sinjal ta' distoċċja. Kwalunkwe anormalità fl-imġiba tat-tibjit jew il-prestazzjoni tat-treddigh għandha tiġi rreġistrata.

▼ M5

43. Il-jum li fih isehh il-hlas huwa l-jum tat-treddigh 0 (LD 0) għall-omm u l-jum ta' wara t-twelid 0 (PND 0) għall-wild. Inkella, it-tqabbil kollha jista' jkun imsejjes fuq żmien ta' wara l-att sesswali biex tiġi eliminata konfużjoni ta' dejta tal-iżvilupp ta' wara t-twelid, minhabba differenzi fid-durata tat-tqala; madankollu, it-twaqqit relatat mal-hlas għandu jiġi rreġistrat ukoll. Dan huwa speċjalment importanti meta s-sustanza kimika tat-test teżerċita influwenza fuq id-durata tat-tqala.

Parametri tal-ulied

44. Kull boton għandu jiġi eżaminat malajr kemm jista' jkun wara l-hlas (PND 0 jew 1) biex jiġu stabbiliti n-numru u s-sess tal-frieħ, ulied imwielta mejtin, ulied imwielta hajjin, u l-preżenza ta' anomaliji grossi (anormalitajiet estrenament vizibbli, inkluzi palat maqsum; emorragiji taht il-ġilda; kulur jew tonalità mhux tas-soltu tal-ġilda; preżenza tal-kurdun; nuqqas ta' halib fl-istonku; preżenza ta' tnixxijiet nixfin). Barra minn hekk, l-ewwel eżami kliniku tan-neonati għandu jinkludi valutazzjoni kwalitattiva tat-temperatura tal-ġisem, l-istat tal-attività u r-reazzjoni għat-tqandil. Il-frieħ misjubin mejtin fil-PND 0 jew fi żmien iktar tard għandhom jiġu eżaminati għal difetti u kawżi tal-mewt possibbli. Il-frieħ hajjin jingħaddu u jintiżnu b'mod individwali fil-PND 0 jew PND 1, u b'mod regolari wara, eż., tal-inqas fil-PND 4, 7, 14, u 21. Eżamijiet kliniċi, kif applikabbli għall-età tal-annimali, għandhom jiġu ripetuti meta jintiżnu l-ulied, jew iktar spiss jekk isiru sejbiet speċifiċi għall-każ fit-twelid. Is-sinjali osservati jistgħu jinkludu, iżda ma jistgħux ikunu limitati għal, anormalitajiet esterni, bidliet fil-ġilda, il-piż, l-ghajnejn, il-membrani mukużi, l-okkorrenza ta' tnixxijiet u eskrezzjonijiet u attività awtomatika. Bidliet fil-mixja, il-pożizzjoni, irrispons għat-tqandil, kif ukoll il-preżenza ta' movimenti kloniċi jew toniċi, sterjotipija jew imġiba stramba, għandhom jiġu rreġistrati wkoll.
45. Id-distanza anogenitali (AGD) ta' kull ferħ għandha titkejjel tal-inqas darba mill-PND 0 sal-PND 4. Il-piż tal-ġisem tal-frieħ għandu jingabar dakinhar li titkejjel l-AGD u l-AGD għandha tiġi normalizzata għal kejl tad-daqs tal-ferħ, idealment l-gherq kwadrat tal-piż tal-ġisem (12). Il-preżenza ta' bżiezel/areoli fi frieħ irġiel għandhom jiġu verifikati fil-PND 12 jew 13.
46. L-annimali F₁ kollha magħżulin huma evalwati kuljum għal separazzjoni balano-prepuzjali jew patenza vaġinali għall-irġiel/nisa rispettivament b'bidu qabel il-jum mistenni għall-kisba ta' dawn il-punti ahħarin biex jinstab jekk maturità sesswali ssehhx kmieni. Għandha tittiehed nota ta' kwalunkwe anormalità tal-organi ġenitali, bhal ħajta vaġinali persistenti, ipospadija jew pene maqsum. Il-maturità sesswali tal-annimali F₁ titqabbel mal-iżvilupp fiziku billi jiġu determinati l-età u l-piż tal-ġisem fis-separazzjoni balano-prepuzjali jew il-ftuħ vaġinali għall-irġiel/nisa rispettivament (13).

Valutazzjoni tan-newrotossicità potenzjali tal-iżvilupp (koorti 2 A u 2B)

47. Ghaxar annimali rġiel u 10 nisa tal-koorti 2 A u 10 annimali rġiel u 10 nisa tal-koorti 2B, minn kull grupp tal-kura (għal kull koorti: raġel 1 jew mara 1 għal kull boton; kull boton rappreżentat minn tal-inqas ferħ 1; għażla aleatorja) għandhom jintużaw għall-valutazzjonijiet tan-newrotossicità. L-annimali tal-koorti 2 A għandhom ikunu soġġetti għal valutazzjonijiet tal-qatgħa awditorja, il-batterija osservazzjonali funzjonali, l-attività motorja (ara l-paragrafi 48-50), u n-newropatoloġija (ara l-paragrafi 74-75). Għandhom isiru sforzi biex jiġi

▼ M5

żgurat li varjazzjonijiet fil-kundizzjonijiet kollha tat-test huma minimi u mhumiex sistematikament relatati mal-kura. Fost il-varjabbli li jiġstghu jaffettwaw l-imġiba huma l-livell tal-hoss (eż. storbju intermittenti), it-temperatura, l-umdità, id-dawl, l-irwejjah, il-hin tal-ġurnata, u distrazzjonijiet ambjentali. Ir-riżultati tal-assaġġi tan-newrotossicità għandhom jiġu interpretati fir-rigward tal-meded storiċi xierqa ta' referenza tal-kontroll. L-annimali tal-koorta 2B għandhom jintużaw għall-valutazzjoni tan-newropatoloġija fil-PND 21 jew PND 22 (ara l-paragrafi 74-75).

48. Fil-PND 24 (± 1 jum) għandu jsir test ta' qatgħa awditorja billi jintużaw annimali fil-koorta 2 A. Il-jum tat-test għandu jkun kontrobalanċjat bejn il-gruppi tal-kura u ta' kontroll. Kull sessjoni tikkonsisti f'50 prova. Fit-tweġit tat-test tal-qatgħa awditorja, għandha tiġi determinata l-amplitudni medja tar-rispons f'kull blokk ta' 10 provi (5 blokk ta' 10 provi), bil-kundizzjonijiet tat-test ottimizzati halli tiġi prodotta drawwa bejn is-sessjonijiet. Dawn il-proċeduri għandhom ikunu konsistenti mal-metodu ta' ttestjar B.53 (35).

49. Fi żmien xieraq bejn il-PND 63 u l-PND 75, l-annimali tal-koorta 2 A jiġu soġġetti għal batterija osservazzjonali funzjonali u test awtomatizzat tal-attività motorja. Dawn il-proċeduri għandhom ikunu konsistenti mal-metodi ta' ttestjar B.43 (33) u B.53 (35). Il-batterija osservazzjonali funzjonali tinkludi deskrizzjoni deskrizzjoni dettaljata tad-dehra, l-imġiba u l-integrità funzjonali tas-suġġett. Din hija vvalutata permezz ta' osservazzjonijiet fil-gaġġa ta' oriġini, wara t-tehid f'arena standard għal osservazzjoni (fil-miftuh) fejn l-annimal jiċċaqlaq b'libertà, u permezz ta' testijiet manipolattivi. It-testijiet għandhom jimxu mill-inqas sal-iktar interattivi. Lista ta' miżuri hija pprezentata fl-Appendiċi 1. L-annimali kollha għandhom jiġu osservati bir-reqqa minn osservaturi mharrġin li mhumiex konxji bl-istatus tal-kura tal-annimali, billi jintużaw proċeduri standardizzati halli tiġi minimizzata l-varjabbiltà tal-osservaturi. Fejn possibbli, huwa rakkomandat li l-istess osservatur jevalwa l-annimali f'test partikolari. Jekk dan mhuwiex possibbli, hemm bżonn li tintwera l-affidabbiltà ta' bejn l-osservaturi. Għal kull parametru fil-batterija tal-ittestjar tal-imġiba, għandhom jintużaw gradi espliciti definiti b'mod operazzjonali u kriterji tal-punteġġ. Jekk possibbli, għandhom jiġu żviluppati miżuri kwantitattivi oġġettivi għal punti aħharin osservazzjonali, li jinvolvu klassifikazzjoni soġġettiva. Għal attività motorja, kull annimali jiġi ttestjat b'mod individwali. Is-sessjoni tat-test għandha tkun twila biżżejjed biex tintwera drawwa bejn is-sessjonijiet għall-kontrolli. L-attività motorja għandha tiġi ssorveljata permezz ta' apparat awtomatizzat ta' registrazzjoni tal-attività li għandu jkun kapaci jidentifika kemm żidiet kif ukoll tnaqqisijiet fl-attività (jiġifieri l-attività bazi kif imkejla mill-apparat ma għandhiex tkun baxxa wisq tant li tipprek-ludi l-identifikazzjoni ta' tnaqqisiet, u lanqas għolja wisq tant li tipprek-ludi l-identifikazzjoni ta' żidiet fl-attività). Kull apparat għandu jkun ittestjat permezz ta' proċeduri standard halli tiġi żgurata, kemm jista' jkun, l-affidabbiltà tal-operazzjoni bejn l-apparati u bejn il-jiem differenti. Kemm jista' jkun, il-gruppi tal-kura għandhom ikunu bbalanċjati bejn l-apparati. Il-gruppi tal-kura għandhom ikunu kontrobalanċjati bejn il-hinijiet tat-test halli tiġi evitata konfużjoni minhabba ritmi ċirkadjani ta' attività.

50. Jekk l-informazzjoni eżistenti tindika l-bżonn li jsir ittestjar funzjonali iehor (eż., sensorjali, soċjali, konjittiv), dawn għandhom jiġu integrati bla ma jikkompromettu l-integrità tal-evalwazzjonijiet l-oħrajn li saru fl-istudju. Jekk dan l-ittestjar isir fl-istess annimali kif użat għall-ittestjar tal-qatgħa awditorja standard, il-batterija osservazzjonali funzjonali u l-attività motorja, għandhom jiġu skedati testijiet differenti halli jiġi minimizzat ir-riskju ta' xekkil tal-integrità ta' dawn it-testijiet. Proċeduri supplementari jiġstghu jkun partikolarment utli meta osservazzjoni empirika, effetti antiċipati, jew il-mekkanistika/il-mod ta' azzjoni jindikaw tip sieċifiku ta' newrotossicità.

▼ M5

Valutazzjoni tal-immunotossicità potenzjali tal-iżvilupp (koorta 3)

51. Fil-PND 56 ($\pm$ 3 ijiem), 10 annimali rġiel u 10 nisa tal-koorta 3 minn kull grupp tal-kura (raġel 1 u mara 1 għal kull boton; il-boton kollha rappreżentati minn tal-inqas ferh wiehed; magħżulin b'mod aleatorju) għandhom jintużaw f'assaġġ tar-rispons tal-antikorpi b'dipendenza fuq iċ-ċellola T, jiġifieri r-rispons primarju tal-antikorpi IgM għal antigen li jiddependi fuq iċ-ċellola T, bħal Ċelloli Ħomor tad-Demm tan-Nagħaġ (SRBC) jew Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), konsistenti ma' proċeduri kurrenti ta' ttestjar tal-immunotossitià (14)(15). Ir-rispons jista' jiġi evalwat permezz ta' għadd taċ-ċelloli speċifiċi li jiffurmaw plakka (PF) fil-milsa jew billi jiġi determinat it-titru tal-antikorp IgM speċifiku għal SRBC jew KLH fis-serum minn ELISA, fl-ogħla livell tar-rispons. Ir-risponsi tipikament jilhqqu l-ogħla livell erba' (rispons tal-PFC) jew hamest (ELISA) ijiem wara l-immunizzazzjoni għal-vina. Jekk ir-rispons primarju tal-antikorpi jiġi assaġġat permezz tal-għadd ta' ċelloli li jiffurmaw plakka, huwa permessibbli li jiġu evalwati sottogruppi ta' annimali f'jiem separati, diment li: l-immunizzazzjoni u s-sagrifiċċju tas-sottogruppi jsiru f'ċertu żmien b'tali mod li l-PFCs jingħaddu fl-ogħla livelli tar-rispons; li s-sottogruppi jkun fihom numru ndaq u lied irġiel u nisa mill-gruppi kollha tad-doża, inkluzi kontrolli; u li s-sottogruppi huma evalwati f'bejn wiehed u iehor l-istess eżemplar ta' wara t-twelid. L-esponiment għas-sustanza kimika tat-test ikompli sal-jum ta' qabel il-għbir tal-milsa għar-rispons tal-PFC jew is-serum għall-assaġġ tal-ELISA.

Valutazzjoni ta' segwitu tat-tossicità riproduttiva potenzjali (koorta 1B)

52. L-annimali tal-koorta 1B jistgħu jinżammu fil-kura wara l-PND 90 u jitgħammru wkoll sabiex tinkiseb generazzjoni F₂ jekk ikun hemm bżonn. L-irġiel u n-nisa tal-istess grupp tad-doża għandhom ikunu koabitati (biex jiġi evitat tlaqqigh ta' ahwa) għal massimu ta' għimghatejn, li jibdwu mill-PND 90 jew wara, iżda mhux wara mill-PND 120. Il-proċeduri għandhom ikunu simili għal dawk għall-annimali P. Madankollu, fuq il-bażi ta' piz tal-evidenza, jista' jkun biżżejjed li l-boton jiġi terminati fil-PND 4 minflok ma jkunu segwiti sal-ftim jew iktar.

OSSERVAZZJONIJIET TERMINALI**Bijokimika klinika/Ematoloġija**

53. L-effetti sistemici għandhom jiġu ssorveljati fl-annimali P. Il-kampjuni tad-demmi wara sawm minn siti definiti jittiehdu minn għaxart irġiel u nisa P magħżulin b'mod aleatorju għal kull grupp tad-doża fit-terminazzjoni, jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa u jiġu soġġetti għal ematoloġija parzjali jew fuq skala shiha, bijokimika klinika, assaġġ tat-T4 u t-TSH jew eżaminati oħrajn issuggeriti mill-profil tal-effetti magħruf tas-sustanza kimika tat-test (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151(40)). Il-parametri ematoloġiċi li għejjin għandhom jiġu eżaminati: ematokrit, konċentrazzjoni ta' emoglobina, għadd tal-eritrociti, għadd totali u differenzjali tal-lewkoċiti, għadd tal-pjastrini u hin/potenzjal ta' għoqiedi tad-demmi. Investigazzjonijiet ta' plażma jew serum għandhom jinkludu: glukożju, kolesterol totali, urea, kreatinina, proteina totali, albumina u tal-inqas żewġ enzimi li jindikaw effetti epatoċellolari (bħal alanina aminotrasferasi, aspartati aminotrasferasi, alkalina fosfatazi, gamma glutamil transpeptidasi u sorbitol deidrogenasi). Il-kejl ta' enzimi u aċidi biljari addizzjonali jistgħu jipprovdu informazzjoni utli f'ċerti ċirkustanzi. Barra minn hekk, jista' jittiehed demm mill-annimali kollha u dan għandu jinħażen għal analiżi possibbli iktar tard biex jgħin halli jiġu ċċarati effetti ekwivokali jew

▼M5

sabiex tiġi ġġenerata dejta dwar l-esponiment intern. Jekk ma jkunx se jsir it-tieni tghammir tal-annimali P, il-kampjuni tad-demmm jittiehdu eżatt qabel il-proċedura fis-sagrifiċċju skedat, jew bħala parti minnha. F'każ li l-annimali jinżammu, il-kampjuni tad-demmm għadhom jingabru ftit jiem qabel ma l-annimali jitghammru għat-tieni darba. Sakemm id-dejta eżistenti minn studji b'doża ripetuta ma jindikawx li l-parametru mhuwiex affettwat mis-sustanza kimika tat-test, għandha ssir urinaliżi qabel it-terminazzjoni u għandhom jiġu evalwati l-parametri li ġejn: id-dehra, il-volum, l-ożmolalita' jew il-gravità speċifika, il-pH, il-proteina, il-glukożju, id-demmm u ċ-ċelloli tad-demmm, il-fdalijiet taċ-ċelloli. L-urina tista' tingabar ukoll biex tiġi ssorveljata l-eskrezzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew il-metabolita/i.

54. L-effetti sistemici għandhom jiġu ssorveljati wkoll fl-annimali F₁. Kampjuni tad-demmm wara sawm minn sit definit jittiehdu minn għaxart irġiel u nisa magħzulin b'mod aleatorju mill-koorta 1 A għal kull doża tal-grupp fit-terminazzjoni, jinħażnu fil-kundizzjonijiet xierqa u jiġu soġġetti għal bijokimika klinika standard, inkluża l-valutazzjoni tal-livelli tas-serum għal ormoni tat-tirojde (T4 u TSH), ematologija (għadd totali u differenzjali tal-lewkoċite flimkien mal-eritroċite) u valutazzjonijiet tal-urinaliżi.
55. Il-frieh żejda fil-PND 4 huma soġġetti għal nekropsija grossa u tingħata kunsiderazzjoni għall-kejl tal-koncentrazzjonijiet tas-serum fl-ormon tat-tirojde (T4). Jekk ikun hemm bżonn, id-demmm ta' daww li jkun għadhom kif twieldu (PND 4) jista' jingabar skont il-boton għal analiżijiet bijokimici/tal-ormon tat-tirojde. Id-demmm jingabar ukoll għal analiżi tat-T4 u t-TSH mill-frieh li għadhom kif infatmu soġġetti għal nekropsija grossa fil-PND 22 (frieh F₁ mhux magħzulin għal koorti).

Parametri tal-isperma

56. Il-parametri tal-isperma għandhom jitkejlu fl-irġiel kollha tal-ġenerazzjoni P sakemm ma jkunx hemm dejta eżistenti x'turi li l-parametri tal-isperma mhumix affettwati fi studju ta' 90 jum. Eżami tal-parametri tal-isperma għandu jsir fl-irġiel kollha tal-koorta 1 A.
57. Fit-terminazzjoni, il-piżijiet tat-testikoli u tal-epididimi jiġu rreġistrati għall-irġiel P u F₁ (koorta 1 A) kollha. Tal-inqas testikola waħda u epididima waħda jinżammu għal eżami istopatologiku. L-epididima li jfidal tintuża għal enumerazzjoni tar-riżervi tal-isperma tal-epididima cauda (16)(17). Barra minn hekk, l-isperma mill-epididima auda (jew vas deferens) tingabar billi jintużaw il-metodi li jnaqqsu l-ħsara għall-evalwazzjoni tal-motilità u l-morfologija tal-isperma (18).
58. Il-motilità tal-isperma tista' jew tiġi evalwata minnufih wara s-sagrifiċċju jew inkella tiġi rreġistrata għal analiżi iktar tard. Il-perċentwal ta' sperma motili b'mod progressiv jista' jiġi determinat jew b'mod soġġettiv jew oġġettiv permezz ta' analiżi taċ-ċaqliq assistita bil-kompjuter (19)(20)(21)(22)(23)(24). Għall-evalwazzjoni tal-morfologija tal-isperma, kampjun tal-isperma epididimali (jew vas deferens) għandu jiġi eżaminat bħala preparazzjonijiet fissi jew imxaarbin (25) u tal-inqas 200 spermatozoa għal kull kampjun għandhom jiġu klassifikati jew bħala normali (kemm ir-ras u l-biċċa tan-nofs/id-denb jidhru normali) jew inkella anormali. Eżempji ta' anormalitajiet morfologiċi tal-isperma jinkludu fużjoni, irjus iżolati, u rjus u/jew dnub sfigurati (26). Irjus tal-isperma sfigurati jew kbar jistgħu jindikaw difetti fl-ispermjazzjoni.
59. Jekk il-kampjuni tal-isperma jkun ffrizati, il-kampjuni fissati u l-immaġnijiet għall-analiżi tal-motilità tal-isperma jiġu rreġistrati fil-hin tan-nekropsija (27), analiżi sussegwenti tista' tkun ristretta għal irġiel tal-kontroll u daww ta' doża għolja. Madankollu, jekk jiġu ossrevati effetti relatati mal-kura, il-gruppi ta' doża inqas ikollhom jiġu evalwati wkoll.

▼ **M5****Nekropsija grossa**

60. Fi zmien it-terminazzjoni jew il-mewt prematura, l-annimali P u F₁ kollha jiġu nekropsjati u eżaminati b'mod mikroskopiku għal kwalunkwe anomalija strutturali jew bidla patoloġika. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għal-organi tas-sistema riproduttiva. Il-hrief li jinqatlu b'mod dinjituż f'kundizzjoni moribonda u l-hrief mejtin għandhom jiġu rreġistrati u, meta jkun għadhom shah, jiġu eżaminati għal difetti possibbli u/jew kawża tal-mewt u jinżammu.
61. Għal nisa P u F₁ adulti, kampjun vaġinali jiġi eżaminat dakinhar tan-nekropsija biex jiġi determinat l-istadju tač-ċiklu estruż u tkun tista' ssir korrelazzjoni mal-istopatoloġija fl-organi riproduttivi. L-utri tan-nisa P kollha (u n-nisa F₁, jekk applikabbli) jiġu eżaminati għall-preżenza u n-numru ta' siti tal-impjant, b'tali mod li ma jxekklix l-evalwazzjoni istopatoloġika.

Piż tal-organi u preservazzjoni tat-tessuti — annimali adulti P u F₁

62. Fil-hin tat-terminazzjoni, il-pizijiet tal-ġisem u l-pizijiet imxarrbin tal-organi elenkati hawn taht mill-annimali P kollha u l-adulti F₁ kollha, minn koorti rilevanti (kif spjegat hawn taht), huma determinati malajr kemm jista' jkun wara d-dissezzjoni sabiex jiġi evitat milli jinxfu. Imbagħad, dawn l-organi għandhom jiġu ppreservati fil-kundizzjonijiet xierqa. Sakemm ma jkunx speċifikat mod ieħor, l-organi f'pari jistgħu jintiżnu b'mod individwali jew flimkien, b'mod konsistenti mal-prattika tipika tal-laboratorju li jagħmel ix-xogħol.

— Utru (b'kanali salovarji u ċerviċi), ovarji,

— Testikoli, epididimidi (total u cauda għall-kampuni użati għall-ġhadd tal-isperma),

— Prostata (il-partijiet dorsolaterali u ventrali f'daqqa). Għandha tingħata attenzjoni meta jinqatal-kumpless tal-prostata biex jiġi evitat titqib tan-nuffati seminali minn il-fluwidu. Fil-każ ta' effett relatat mal-kura fuq il-piż totali tal-prostata, is-segmenti dorsolaterali u ventrali għandhom jiġu dissezzjonati bir-reqqa wara l-fissazzjoni, u għandhom jintiżnu b'mod separat,

— Nuffati seminali bi glandoli koagulanti u l-fluwidi tagħhom (bħala unità waħda),

— Moħħ, fwied, kliewi, qalb, milsa, il-glandoli tat-timu, pitwitarja, tat-tirojde (wara l-fissazzjoni), adrenali u l-organi jew it-tessuti fil-mira magħrufin.

63. Minbarra l-organi elenkati hawn fuq, kampjuni ta' nerv periferali, muskolu, sinsla tad-dahar, għajn flimkien man-nerv ottiku, apparat gastrointestinali, apparat tal-urina, pulmun, trakea (bit-tirojde u l-paratirojde mqabbdin), mudullun tal-ġhadam, vas deferens (irġiel), glandola tal-halib (irġiel u nisa) u vaġina għandhom jiġu ppreservati f'kundizzjonijiet xierqa.

64. L-organi kollha tal-annimali tal-koorta 1 A ser jintiżnu u ser jiġu ppreservati għal istopatoloġija.

65. Għall-investigazzjoni ta' effetti immunotossiċi kkaġunati qabel u wara t-twelid, 10 annimali rġiel u 10 nisa mill-koorta 1 A minn kull grupp tal-kura (raġel wiehed jew mara waħda għal kull boton; il-boton kollha rappreżentati minn tal-inqas ferħ 1; għażla aleatorja) ser ikunu soġġetti għal dan li ġej fit-terminazzjoni:

— ser jintiżnu n-nodi tal-limfa assoċjati ma' u distanti mir-rotta ta' espo-niment (minbarra l-piż tal-glandoli adrenali, it-timu u l-milsa, li diġà sar fl-annimali kollha tal-koorta 1 A),

▼ M5

- analiżi tal-limfoċite splenika tas-sottopopolazzjoni (limfoċiti T, limfoċiti B ta' CD4+ u CD8+ u ċelloli qattielja naturali) billi jintuża nofs il-milja, bin-nofs l-iehor tal-milja jinżamm għal evalwazzjoni istopatoloġika.

Analiżi tas-sottopopolazzjoni tal-limfoċite splenika f'annimali mhux immunnizzati (koorta 1 A) ser tiddetermina jekk l-esponiment huwiex relatat ma' bidla fid-distribuzzjoni immunoloġika fi stat kostanti ta' limfoċiti "li jghinu" (CD4+) jew ċitotossiċi (CD8+) li ġejjin mit-timu jew ċelloli qattielja naturali (NK) (risponsi rapidi għal ċelloli neoplastiċi u patoġeni).

66. Għall-annimali tal-koorta 1B, għandhom jintiżnu l-organi li ġejjin u jiġu pproċessati għall-istadju tal-blokk it-tessuti korrispondenti li ġejjin:

- Vagīna (mingħajr ma tintiżen),
- Utru biċ-ċerviċi,
- Ovarji,
- Testikoli (tal-inqas waħda),
- Epididimidi,
- Nuffati seminali u glandoli koagulanti,
- Prostata,
- Pitwitarja,
- Organi fil-mira identifikati.

L-istopatoloġija fil-koorta 1B issir jekk ir-riżultati mill-koorta 1 A joħolqu ekwivoku jew f'każijiet ta' tossikanti riproduttivi jew endokrinali ssuspettati.

67. Il-koorti 2 A u 2B: Ittestjar tan-newrotossiċità tal-iżvilupp (PND 21 jew PND 22 u ulied adulti). L-annimali tal-koorta 2 A huma terminati wara ttestjar tal-imġiba, bil-piż tal-moħħ irreġistrat u newroistopatoloġija shiħa għal skopijiet ta' valutazzjoni tan-newrotossiċità. L-annimali tal-koorta 2B huma terminati fil-PND 21 jew PND 22, bil-piż tal-moħħ irreġistrat u eżami mikroskopiku tal-moħħ għal finijiet tal-valutazzjoni tan-newrotossiċità. Il-fissazzjoni tal-perfuzjoni hija meħtieġa għall-annimali tal-koorta 2 A u fakultattiva għal annimali tal-koorta 2B, kif stipulat fil-metodu ta' ttestjar B.53 (35).

Piż tal-organi u preservazzjoni tat-tessuti — Annimali F₁ miftumin

68. Il-frieh mhux magħżulin għal koorti, inklużi frieh żgħar wisq, huma terminati wara l-ftim, fil-PND 22, sakemm ir-riżultati ma jindikawx il-bżonn ta' iktar investigazzjonijiet matul il-hajja. Il-frieh terminati huma soġġetti għal nekropsija grossa inkluża valutazzjoni tal-organi riproduttivi, kif deskritti fil-paragrafi 62 u 63. Għal massimu ta' 10 frieh għal kull sess għal kull grupp, minn kemm jista' jkun boton, il-moħħ, il-milja, u t-timu għandhom jintiżnu u jinżammu f'kundizzjonijiet xierqa. Barra minn hekk, it-tessuti mammarji għal dawn il-frieh irġiel u nisa jistgħu jiġu ppreservati għal analiżijiet mikroskopiċi ulterjuri⁽¹⁾ (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151 (40)). L-anomalitajiet grossi u t-tessuti fil-mira għandhom jinżammu għal eżami istoloġiku possibbli.

⁽¹⁾ Ir-riċerka wriet li l-glandola tal-halib, speċjalment fl-iżvilupp tal-glandola tal-halib fil-hajja bikrija, hija punt aħhari sensitiv għal azzjoni estrogena. Huwa rakkomandat li, meta jkunu validati, f'dan il-metodu ta' ttestjar għandhom ikunu inklużi l-punti aħharin li jinvolvu l-glandoli tal-halib tal-frieh taz-zewġ sessi.

▼ **M5****Istopatoloġija — annimali P**

69. Istopatoloġija shiha tal-organi elenkati fil-paragrafi 62 u 63 issir għall-annimali P kollha tad-doża għolja u ta' kontroll. L-organi li juru bidliet relatati mal-kura għandhom jiġu eżaminati fl-annimali kollha fil-gruppi ta' doża inqas sabiex jgħinu fid-determinazzjoni ta' NOAEL. Barra minn hekk, l-organi riproduttivi tal-annimali kollha ssuspettati b'fertilità mnaqsa, eż., dawk li naqsu milli jitghammru, iwelldu, inisslu, jew iwelldu wlied b'saħħithom, jew li għalihom ġew affettwati ċ-ċikličità estrużi jew in-numru, il-motilità, jew il-morfoloġija tal-isperma u l-leżjonijiet gross kollha għandhom ikunu soġġetti għal evalwazzjoni istopatoloġika.

Istopatoloġija — Annimali F₁*Annimali tal-koorta 1*

70. Issir istopatoloġija shiha tal-organi elenkati fil-paragrafi 62 u 63 għall-annimali adulti kollha ta' doża għolja u tal-kontroll mill-koorta 1 A. Il-boton kollha għandhom ikunu rappreżentanti minn tal-inqas ferh 1 għal kull sess. L-organi u t-tessuti li juru bidliet relatati mal-kura u l-leżjonijiet gross kollha għandhom ikunu eżaminati fl-annimali kollha fil-gruppi ta' doża inqas biex jgħinu fid-determinazzjoni ta' NOAEL. Għall-evalwazzjoni ta' effetti kkaġunati qabel u wara t-twelid fuq organi limfojdi, għandha tiġi evalwata wkoll l-istopatoloġija ta' 10 annimali rġiel u 10 nisa mill-koorta 1 A fuq in-nodi tal-limfa u l-mudullun tal-ghadam miġburin wara l-evalwazzjoni istopatoloġika tat-timu, il-milsa, u l-glandoli adrenali li diġà saret fl-annimali 1 A kollha.
71. Tessuti riproduttivi u endokrinali mill-annimali kollha tal-koorta 1B, ipproċessati għall-istadju tal-blokk kif spjegat fil-paragrafu 66, għandhom jiġu eżaminati għal istopatoloġija f'kazijiet ta' tossikanti riproduttivi jew endokrinali ssuspettati. Il-koorta 1B għandu jsirilha wkoll eżami istoloġiku jekk ir-riżultati mill-koorta 1 A jgħid li jkun hemm problema.
72. L-ovarji ta' nisa adulti għandu jkun fihom follikoli primordjali u li qed jikbru, kif ukoll corpora lutea; għalhekk, eżami istopatoloġiku għandu jkollu l-għan li jidentifika evalwazzjoni kwantitattiva tal-follikoli primordjali u oħra li qed jikbru, kif ukoll corpora lutea, f'nisa F₁; in-numru ta' annimali, l-għażla tas-sezzjoni tal-ovarji, u d-daqs tal-kampjun tas-sezzjoni għandhom ikunu statistikament xierqa għall-proċedura ta' evalwazzjoni użata. L-enumerazzjoni follikolari tista' ssir għall-ewwel fuq annimali tal-kontroll u ta' doża għolja, u fil-każ ta' effett avvers f'dawn tal-aħħar, għandhom jiġu eżaminati dozi inqas. L-eżami għandu jinkludi enumerazzjoni tan-numru ta' follikoli primordjali, li jista' jingħaqad ma' follikoli żgħar li qed jikbru, għat-tqabbil ta' ovarji kkurati u tal-kontroll (ara d-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 151 (40)). Il-valutazzjoni tal-corpora lutea għandha ssir b'mod parallel mal-ittestjar ta' ċikličità estruża sabiex l-istadju ta' ċiklu jkun jista' jittiehed f'kunsiderazzjoni fil-valutazzjoni. Il-kanal salovarju, l-utru u l-vaġina jiġu eżaminati għal żvilupp xieraq tipiku tal-organi.
73. Eżamijiet dettaljati tal-istopatoloġija testikolari jsiru fuq l-irġiel F₁ sabiex jiġu identifikati effetti relatati mal-kuar fuq id-differenzazzjoni u l-iżvilupp tat-testikoli u fuq l-ispermatoġenisi (38). Meta jkun possibbli, għandhom jiġu eżaminati sezzjonijiet tax-xibka testikolari. Caput, corpus, u cauda tal-epididimi u l-vas deferens jiġu eżaminati għal żvilupp xieraq tipiku tal-organi, kif ukoll għall-parametri meħtieġa għall-irġiel P.

▼ M5

Annimali tal-koorta 2

74. Issir newroistopatoloġija għall-annimali kollha ta' doża għolja u tal-kontroll tal-koorta 2 A għal kull sess wara li jitlestha l-ittestjar tan-newromġiba (wara PND 75, iżda mhux wara PND 90). L-istopatoloġija tal-mohħ issir għall-annimali kollha ta' doża għolja u tal-kontroll tal-koorta 2B għal kull sess fil-PND 21 jew PND 22. L-organi jew it-tessuti li juru bidliet relatati mal-kura għandhom jiġu eżaminati wkoll għall-annimali fil-gruppi ta' doża inqas biex tithaffef id-determinazzjoni ta' NOAEL. Għall-annimali tal-koorta 2 A u 2B, jiġu eżaminati bosta sezzjonijiet mill-mohħ biex ikun jista' jsir eżami tal-basal olfattivi, il-kortiċi ċerebrali, l-ippokampu, il-gangliji tal-bażi, it-talamu, l-ipotalamu, il-meżenċefalu (tekum, tegmentum, u pendunkuli ċerebrali), iz-zokk enċefaliku u ċ-ċervellet. Għall-koorta 2 A biss, jiġu eżaminati l-ghajnejn (ir-retina u n-nerv ottiku) u kampjuni ta' nerv periferiku, muskolu u sinsla tad-dahar. Il-proċeduri newroistoloġiċi kollha għandhom ikun konsistenti mal-metodu ta' ttestjar B.53 (35).
75. Għandhom isiru evalwazzjonijiet morfometriċi (kwantitattivi) fuq zoni rappreżentattivi tal-mohħ (sezzjonijiet omologi magħżulin bir-reqqa fuq il-bażi ta' punti mikroskopiċi ta' riferiment affidabbli) u jistgħu jinkludu kejljet lineari u/jew areali ta' reġjuni speċifiċi tal-mohħ. Għandhom jittiehdu tal-inqas tliet sezzjonijiet konsekuttivi f'kull punt ta' riferiment (livell) sabiex tingħażel l-iktar sezzjoni omologa u rappreżentattiva għaż-żona speċifika tal-mohħ li ser tiġi evalwata. In-newropatoloġist għandu jeżerċita ġudizzju xieraq dwar jekk it-taqsimiet imhejjin għall-kejl humiex omologi ma' oħrajn fis-sett tal-kampjun u għaldaqstant, xierqa għal inkluzjoni, peress li l-kejljet lineari b'mod partikolari jistgħu jinbidlu fuq distanza relattivament qasira (28). Ma għandhomx jintużaw sezzjonijiet mhux omologi. Filwaqt li l-għan huwa li jittiehed kampjun tal-annimali kollha riżervati għal dan l-għan (10/sess/livell tad-doża), numri inqas xorta jistgħu jkunu adegwati. Madankollu, kampjuni minn inqas minn 6 annimali/sess/-livell tad-doża ġeneralment ma jitqisux biżżejjed għall-finijiet ta' dan il-metodu ta' ttestjar. L-istereoloġija tista' tintuża biex tidentifika effetti relatati mal-kura fuq parametri bħall-volum jew in-numru ta' ċelloli għar-reġjuni newroanatomiċi speċifiċi. L-aspetti kollha tat-thejjija tal-kampjuni tat-tessuti, mill-fissazzjoni tat-tessuti, sad-dissezzjoni tal-kampjuni tat-tessuti, l-ipproċessar tat-tessuti, u t-tilwin tas-slides, għandhom ihaddmu disinn kontrobilanċjat, b'tali mod li kull lott ikun fih kampjuni rappreżentattivi minn kull grupp tad-doża. Meta jkunu ser jintużaw analizijiet morfometriċi jew stereoloġiċi, it-tessut tal-mohħ għandu jitqiegħed fil-midjums xierqa fil-livelli tad-doża kollha fl-istess hin sabiex jiġu evitati tiċkin tal-oġġetti assoċjati ma' hżin prolongat f'fissattiv.

RAPPORTAR

Dejta

76. Id-dejta tiġi rrapportata b'mod individwali u tingħabar fil-qosor f'forma ta' tabelli. Fejn xieraq, għal kull grupp tat-test u kull ġenerazzjoni, għandhom jiġu rrapportati dawn i ġejjin: in-numru ta' annimali fil-bidu tat-test, in-numru ta' annimali misjubi mejtin matul it-test jew inqatlu għal raġunijiet umanitarji, il-hin ta' kwalunkwe mewta jew qtil umanitarju, in-numru ta' annimali fertili, in-numru ta' nisa tqal, in-numru ta' nisa li qed iwelldu boton, u n-numru ta' annimali li qed juru sinjali ta' tossiċità. Għandha tiġi rrapportata wkoll deskrizzjoni tat-tossiċità, inkluzi l-hin tal-bidu, id-durata u s-severità.
77. Ir-riżultati numeriċi għandhom jiġu rrapportati permezz ta' metodu statistiku xieraq u aċċettat. Il-metodi statistiċi għandhom jingħazlu bħala parti mid-disinn tal-istudju u għandhom jindirizzaw kif xieraq dejta mhux normali (eż., dejta tal-ghadd), dejta ċċensurata (eż., hin ta' osservazzjoni limitat), nuqqas ta' indipendenza (eż., effetti tal-boton u mizuri ripetuti) u

▼ **M5**

varjanzi mhux indaqs. Mudelli mhalltin lineari ġeneralizzati u mudelli ta' rispons għad-doża jkopru klassi wiesgħa ta' għodod analitiċi li jistgħu jkunu xierqa għad-dejta ġġenerata f'dan il-metodu ta' ttestjar. Ir-rapport għandu jinkludi biżżejjed informazzjoni dwar il-metodu ta' analiżi u l-programm tal-kompjuter użat, sabiex statistsiku/reviżur indipendenti jkun jista' jevalwa/jerġa' jevalwa l-analiżi.

Evalwazzjoni tar-riżultati

78. Is-sejbiet għandhom jiġu evalwati f'termini tal-effetti osservati, inklużi sejbiet mikroskopiċi u fin-nekropsija. L-evalwazzjoni tinkludi r-relazzjoni, jew in-nuqqas tagħha, bejn id-doża u l-preżenza, l-inċidenza u s-severità tal-anormalitajiet, inklużi leżjonijiet grossi. Għandhom jiġu vvalutati wkoll l-organi fil-mira, il-fertilità, l-anormalitajiet kliniċi, il-prestazzjoni riproduttiva u tal-boton, il-bidliet fil-piż tal-ġisem, il-mortalità u kwalunkwe effett tossiku u tal-iżvilupp iehor. Għandha tingħata attenzjoni speċjali lil bidliet speċifiċi għas-sess. Il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, u meta disponibbli, dejta dwar it-TK, inklużi t-trasferiment plaċentali u l-eskrezzjoni tal-halib, għandhom jiġu kkunsidrati wkoll meta jiġu evalwati r-riżultati tat-test.

Rapport tat-test

79. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja miksuba f'dan l-istudju minn annimali P, F₁ u annimali F₂ (fejn rilevanti):

Sustanza kimika tat-test:

- L-informazzjoni rilevanti disponibbli kollha dwar il-proprjetajiet kimiċi, tossikokinetiċi u tossikodinamiċi tas-sustanza kimika tat-test,
- Id-dejta ta' identifikazzjoni,
- Il-purità.

Veikolu (jekk xieraq):

- Il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu jekk mhuwiex ilma.

Annimali tat-test:

- L-ispeċi/ir-razza użati,
- In-numru, l-età u s-sess tal-annimali,
- Is-sors, il-kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija, id-dieta, il-materjali tat-tibjit, eċċ.,
- Il-piżijiet individwali tal-annimali fil-bidu tat-test,
- Dejta dwar il-kampjun vaginali għal nisa P qabel tinbeda l-kura (jekk id-dejta tingħabar f'dak iż-żmien),
- Rekords dwar it-tlaqqiġ tal-ġenerazzjoni P li jindikaw is-sieheb u s-sieħba li tghammru u s-suċċess tat-tghammir,
- Rekords dwar il-boton ta' origini għall-annimali adulti tal-ġenerazzjoni F₁.

Kundizzjonijiet tat-test:

- Ġustifikazzjoni għall-għażla tal-livell tad-doża,
- Dettalji tal-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test/preparazzjoni tad-dieta, il-konċentrazzjonijiet miksubin,

▼ M5

- L-istabbiltà u l-omoġenità tal-preparazzjoni fil-veikolu jew it-trasportatur (eż., dieta, ilma tajjeb ġhax-xorb), fid-demm u/jew il-halib bil-kundizzjonijiet ta' użu u ħżin bejn l-użi,
- Dettalji tal-ġhoti tas-sustanza kimika tat-test,
- Konverżjoni minn konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (ppm) f'ilma tajjeb ġhax-xorb/dieta għad-doża miksba (mg/kg piż tal-ġisem/jum), jekk applikabbli,
- Dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u l-ilma (inkluża l-kompożizzjoni tad-dieta, jekk disponibbli),
- Deskrizzjoni dettaljata tal-proċeduri ta' każwalizzazzjoni biex jingħazlu frieh għas-separazzjoni u biex jiġu assenjati frieh għall-gruppi tat-test,
- Il-kundizzjonijiet ambjentali,
- Il-lista tal-persunal tal-istudju, inkluż it-taħriġ professjonali.

Riżultati (sommarju u dejta individwali skont is-sess u d-doża):

- Konsum ta' ikel, konsum ta' ilma jekk disponibbli, effiċjenza tal-ikel (żieda fil-piż tal-ġisem għal kull gramma ikel ikkonsumat, hlief għall-perjodu ta' koabitazzjoni u matul it-treddigh), u konsum tas-sustanza kimika tat-test (għal għoti permezz ta' dieta/ilma tajjeb ġhax-xorb) għall-annimali P u F₁,
- Dejta dwar l-assorbiment (jekk disponibbli),
- Dejta dwar il-piż tal-ġisem għall-annimali P,
- Dejta dwar il-piż tal-ġisem għall-annimali F₁ magħżulin wara l-ftim,
- Il-hin tal-mewt matul l-istudju jew jekk l-annimali baqgħux hajjin wara t-terminazzjoni,
- L-ghamla, is-severità u d-durata tal-osservazzjonijiet kliniċi (jekk humiex reversibbli jew le),
- Dejta dwar l-ematoloġija, l-urinaliżi u l-kimika klinika inklużi TSH u T₄,
- Analizi fenotipika taċ-ċelloli tal-milsa (ċelloli T, B, NK),
- Ċelloli tal-mudullun tal-ghadam,
- Dejta dwar ir-rispons tossiku,
- In-numru ta' nisa P u F₁ b'ċiklu estruż normali jew anormali u d-durata taċ-ċiklu,
- Żmien sat-tgħammir (intervall qabel l-att sesswali, in-numru ta' jiem bejn it-tlaqqiġ u t-tgħammir),
- Effetti tossiċi jew oħrajn fuq ir-riproduzzjoni, inklużi numri u perċentwali ta' annimali li rnexxew fit-tgħammir, it-tqala, il-hlas u t-treddigh, ta' rġiel li kkaġunaw it-tqala, ta' nisa b'sinjali ta' distoċja/hlas prolungat jew diffiċli,
- Id-durata tat-tqala u, jekk disponibbli, tal-hlas,
- In-numri ta' impjanti, id-daqs tal-boton u l-perċentwal ta' frieh irġiel,
- In-numru u l-perċentwal ta' telf ta' wara l-impjant, annimali mwielda hajjin u annimali mwielda mejtin,

▼ **M5**

- Dejta dwar il-piż tal-boton u l-piż tal-frieh (irgiel, nisa u f'daqqa), in-numru ta' annimali li baqghu żgħar jekk determinat,
- In-numru ta' frieh b'anormalitajiet ferm vizibbli,
- Effetti tossiċi jew oħrajn fuq l-ulied, it-tkabbir wara t-twelid, il-vijabbiltà, eċċ.,
- Dejta dwar punti ta' riferiment fiżiċi fi frieh u dejta oħra dwar l-iżvilupp wara t-twelid,
- Dejta dwar il-maturità sesswali ta' annimali F_1 ,
- Dejta dwar osservazzjonijiet funzjonali fi frieh u adulti, skont kif applikabbli,
- Il-piż tal-ġisem fis-sagrifiċċju u dejta dwar il-piż tal-organi relattiv u assolut għal annimali P u annimali adulti F_1 ,
- Is-sejbiet fin-nekropsija,
- Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet istopatoloġiċi kollha,
- In-numru totali ta' sperma epididimali cauda, il-perċentwal ta' sperma progressivament motili, il-perċentwal ta' sperma morfologikament normali, u l-perċentwal ta' sperma b'kull anormalità identifikata għal irgiel P u F_1 ,
- In-numri u l-istadji tal-maturità tal-follikoli li jinsabu fl-ovarji tan-nisa P u F_1 , fejn applikabbli,
- Enumerazzjoni tal-corpora lutea fl-ovarji tan-nisa F_1 ,
- Trattament statistiku tar-risultati, fejn xieraq.

Parametri tal-koorta 2:

- Deskrizzjoni dettaljata tal-proċeduri użati biex jiġu standardizzati osservazzjonijiet u proċeduri kif ukoll definizzjonijiet operazzjonali għall-ghoti ta' punteġġ għall-osservazzjonijiet,
- Lista tal-proċeduri kollha tat-test użati, u ġustifikazzjoni għall-użu tagħhom,
- Dettalji tal-proċeduri tal-imġiba/funzjonali, newropatoloġiċi u morfometriċi użati, inkluża informazzjoni u dettalji dwar apparati awtomatizzati,
- Proċeduri għall-kalibraġġ u l-iżgurar tal-ekwivalenza tal-apparati u l-ibbilanċjar tal-gruppi tal-kura fil-proċeduri ta' ttestjar,
- Ġustifikazzjoni qasira li tispjega kwalunkwe deċiżjoni li tinvolvi ġudizzju professjonali,
- Deskrizzjoni dettaljata tas-sejbiet kollha dwar l-imġiba/funzjonali, newropatoloġiċi u morfometriċi skont is-sess u l-grupp tad-doża, inklużi kemm židiet kif ukoll tnaqqisiet mill-kontrolli,
- Il-piż tal-moħħ,
- Kwalunkwe dijanjosi li ġejja minn sinjali newroloġiċi u leżjonijiet, inkluż mard jew kundizzjonijiet li jseħhu b'mod naturali,
- Stampi ta' sejbiet eżemplari,
- Stampi b'enerġija baxxa biex tiġi vvalutata l-omoloġija tas-sezzjonijiet użati għall-morfometrija,

▼ M5

- Trattament statistiku tar-riżultati, inklużi l-mudelli statistiċi użati biex tiġi analizzata d-dejta, r-riżultati, indipendentement minn jekk kinux sinifikanti jew le,
- Ir-relazzjoni ta' kwalunkwe effett tossiku iehor ma' konklużjoni dwar il-potenzjal newrotossiku tas-sustanza kimika tat-test, skont is-sess u l-grupp tad-doża,
- L-impatt ta' kwalunkwe informazzjoni tossikokinetika fuq il-konklużjonijiet,
- Dejta li ssostni l-affidabbiltà u s-sensittività tal-metodu ta' ttestjar (jiġifieri dejta tal-kontroll pożittiv u storiku),
- Ir-relazzjonijiet, jekk jeżistu, bejn l-effetti newropatoloġiċi u funzjonali,
- L-NOAEL jew id-doża ta' riferiment għal ommijiet u wlied, skont is-sess u l-grupp tad-doża,
- Diskussjoni tal-interpretazzjoni ġenerali tad-dejta fuq il-bażi tar-riżultati, inkluża konklużjoni dwar jekk is-sustanza kimika kkaġunatx newrotossicità tal-iżvilupp u l-NOAEL.

Parametri tal-koorta 3:

- Titri tal-antikorp IgM tas-serum (sensitizzazzjoni għal SRBC jew KLH), jew unitajiet PFC IgM tal-milsa (sensitizzazzjoni għal SRBC);
- It-tweġġ tal-metodu TDAR għandu jkun ikkonfermat bħala parti mill-proċess ta' ottimizzazzjoni mil-laboratorju li jhejji l-assaġġ għall-ewwel darba, u b'mod perġodiku (eż. kull sena) mil-laboratorji kollha;
- Diskussjoni tal-interpretazzjoni ġenerali tad-dejta fuq il-bażi tar-riżultati, inkluża konklużjoni dwar jekk is-sustanza kimika kkaġunatx immunotossicità tal-iżvilupp u l-NOAEL;

*Diskussjoni tar-riżultati**Konklużjonijiet, inklużi l-valuri tal-NOAEL għal effetti fuq il-ġenituri u l-ulied*

Għandha tiġi pprovduta wkoll l-informazzjoni kollha mhux miksuba matul l-istudju, iżda li hija utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati (eż., similaritajiet tal-effetti għal kwalunkwe newrotossikant magħruf).

Interpretazzjoni tar-Riżultati

80. Studju Estiż tat-Tossicità Riproduttiva ta' Ġenerazzjoni Wahda ser jipprovdi informazzjoni dwar l-effetti ta' esponiment ripetut għal sustanza kimika matul il-fażijiet kollha taċ-ċiklu riproduttiv, kif ikun hemm b'żonn. B'mod partikolari, l-istudju jipprovdi informazzjoni dwar is-sistema riproduttiva, u dwar l-iżvilupp, it-tkabbir, is-sopravvivenza u l-punti aħħarin funzjonali tal-ulied sal-PND 90.
81. L-interpretazzjoni tar-riżultati tal-istudju għandhom jiehdu f'kunsiderazzjoni l-informazzjoni kollha għad-dispożizzjoni dwar is-sustanza kimika, inklużi proprjetajiet fiżikokimiċi, tat-TK u tossikodinamiċi, l-informazzjoni rilevanti disponibbli dwar analogi strutturali, u riżultati ta' studji dwar it-tossicità li saru qabel bis-sustanza kimika tat-test (eż., tossicità akuta, tossicità wara applikazzjoni ripetuta, studji mekkanistiċi u studji li jivvalutaw jekk hemmx differenzi kwalitattivi u kwantitattivi sostanzjali bejn l-ispeċi fi proprjetajiet metaboliċi *in vivo/in vitro*). Ir-riżultati tan-nekropsija grossa u tal-piż tal-organi għandhom jiġu vvalutati fil-kuntest ma' osservazzjonijiet li jsiru fi studji oħrajn b'doża ripetuta, meta dan ikun fattibbli. It-tnaqqisiet fit-tkabbir tal-ulied jistgħu jitqiesu f'relazzjoni ma' influwenza tas-sustanza kimika tat-test fuq il-kompożizzjoni tal-halib (29).

▼ M5

Koorta 2 (Newrotossicità tal-iżvilupp)

82. Ir-riżultati tan-newromgħiba u n-newropatoloġija għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tas-sejbiet kollha, billi jintuża approċċ tal-piż tal-evidenza b'gudizzju esperti. Għandhom jiġu diskussi l-mudelli tas-sejbiet tal-imgħiba jew morfologiċi, jekk ikunu preżenti, kif ukoll evidenza tar-rispons għad-doża. L-evalwazzjoni tan-newrotossicità tal-iżvilupp, inklużi studji epidemjologiċi tal-bniedem jew rapporti tal-każ, u studji sperimentali ta' annimali (eż. dejta tossikokinetika, informazzjoni dwar l-istruttura-attività, dejta minn studji oħrajn tat-tossicità) għandha tkun inkluża f'din il-karatterizzazzjoni. Evalwazzjoni tad-dejta għandha tinkludi diskussjoni kemm tal-importanza bijoloġika kif ukoll statistika. L-evalwazzjoni għandha tinkludi r-relazzjoni, jekk ikun hemm wahda, bejn l-alterazzjonijiet newropatologiċi u tal-imgħiba osservati. Għal gwida dwar l-interpretazzjoni tar-riżultati tan-newrotossicità tal-iżvilupp, irreferi għall-metodu ta' ttestjar B.53 (35) u Tyl et al., 2008 (31).

Koorta 3 (Immunotossicità tal-iżvilupp)

83. Trażzin jew tishih tal-funzjoni immuni kif ivvalutata bit-TDAR (rispons tal-antikorpi li jiddependu fuq iċ-ċelloli T), għandhom jiġu evalwati fil-kuntest tal-osservazzjonijiet kollha li jkunu saru. Is-sinifikanza tal-eżitu tat-TDAR tista' tkun sostnuta b'effetti oħrajn fuq indikaturi relatati immunologikament (eż., ċellolarità tal-mudullun tal-għadam, il-piż u l-ispatoloġija tat-tessuti limfoċiti, id-distribuzzjoni tas-sottosett tal-limfoċiti). L-effetti stabbiliti bit-TDAR jistghu jkunu inqas sinifikanti f'każ ta' tossicitajiet oħrajn osservati f'konċentrazzjonijiet iżgħar ta' esponiment.
84. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 43 għandu jiġi kkonsultat għal għajnuna fl-interpretazzjoni tar-riżultati dwar ir-riproduzzjoni u n-newrotossicità (26).

TAGHRIF

- (1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69-98.
- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- (3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.

▼ M5

- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409-421.
- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.

▼M5

- (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Kompjuter-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
- (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
- (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Parigi.
- (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
- (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
- (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
- (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Cavinness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
- (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
- (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, Linja Gwida tal-OECD għall-Ittestjar ta' Sustanzi Kimiċi, Nru 422, OECD, Parigi.
- (33) Il-Kapitolu B.43 ta' dan l-Anness, Studju tan-Newrotossicità fir-Rodituri
- (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Parigi.
- (35) Il-Kapitolu B.53 ta' dan l-Anness, Studju tan-Newrotossicità tal-Iżvilupp
- (36) Il-Kapitolu B.54 ta' dan l-Anness, Bijjoassagg Uterotrofiku fir-Rodituri: Test ta' Tgharbil fuq terminu qasir għal Proprjetajiet Estroġeniċi
- (37) Il-Kapitolu B.55 ta' dan l-Anness, Il-Bijjoassagg Hershberger fil-Firien: Assagg ta' Tgharbil fuq Terminu Qasir għal Proprjetajiet (Anti)Androġeniċi

▼ M5

- (38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Parigi.
- (39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Kanada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Parigi.
- (40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Parigi.

▼ **M5***Appendiċi 1***Miżuri u osservazzjonijiet inkludi fil-batterija osservazzjonali funzjonali (Koorta 2A)**

Gagġa ta' Orġini u fil-Berah	Manipolattivi	Fizjoloġiċi
Pożizzjoni	Facilità ta' tnehhija	Temperatura
Kloniċi u Toniċi Involuntarji	Facilità ta' tqandil	Piż tal-ġisem
Gheluq tal-Kappell tal-Għajn	Ton tal-Muskolu	Rispons tal-habba
Piloerezzjoni	Rispons għall-Vicinanza	Daqs tal-habba
Salivazzjoni	Rispons għall-Mess	
Dmugh	Rispons Awditorju	
Tlehhin	Rispons għal Qarsa tad-Denb	
Qawmien f'pożizzjoni wieqfa	Rispons għal Qawmien f'Pożizzjoni Drita	
Anormalitajiet fil-mixja	Ftuh tas-Sieq ta' Nzul	
Koxjenza	Sahha fl-Għalfsa tas-Sieq ta' Quddiem	
Sterjotipija	Sahha fl-Għalfsa tas-Sieq ta' Wara	
Imġiba Stramba		
Razez		
Anormalitajiet fit-Tehid tan-Nifs		

▼ M5

Appendiċi 2

DEFINIZZJONIJIET:

Sustanza Kimika: Sustanza jew tahlita.

Sustanza Kimika tat-Test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ M5

B.57. H295R ASSAĠĠ TAL-ISTEROJDOĠENESI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar it-Testijiet (TG) tal-OECD Nru 456 (2011). Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi linji gwida dwar it-testijiet eżistenti, u tiżviluppa godda, għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali. Il-Qafas Kunċenttwali tal-2002 tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni tas-Sustanzi Kimiċi Interferenti Endokrinali jinvolve hames livelli, b'kull livell li jikkorrispondi għal livell differenti ta' kumplessità bijoloġika (1). L-Assaġġ tal-Isterojdoġenesi *in vitro* H295R (H295R) deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar juża linja ta' ċelloli adrenokarċinoma tal-bniedem (ċelloli NCI-H295R) u jikkostitwixxi "assaġġ *in vitro* tat-2 livell, li jipprovdi dejta mekkanistika", li għandu jintuża għal finijiet ta' tgħarbil u prijorizzazzjoni. L-iżvilupp u l-istandardizzazzjoni tal-assaġġ bħala tgħarbil għal effetti kimiċi fuq sterojdoġenesi, speċifikament il-produzzjoni ta' 17 β -estradiol (E2) u testosterone (T), twettqu fi proċess b'bosta stadji. L-assaġġ H295R gie ottimizzat u vvalidat (2)(3)(4)(5).
2. L-għan tal-Assaġġ tal-Isterojdoġenesi H295R huwa li jidentifika sustanzi kimiċi li jaffettwaw il-produzzjoni ta' E2 u T. L-assaġġ H295R huwa maħsub sabiex jidentifika ksenobijotiċi li bħala s-sit(i) fil-mira tagħhom għandhom il-komponenti endoġeni li jinvolve l-mogħdija bijokimika intra-ċellolari li tidba bis-sekwenza ta' reazzjonijiet mill-kolesterol sal-produzzjoni ta' E2 u/jew T. L-assaġġ H295R mhuwiex maħsub sabiex jidentifika sustanzi kimiċi li jaffettwaw l-isterojdoġenesi minhabba effetti fuq l-assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG). L-għan tal-assaġġ huwa li jipprovdi tveġiba IVA/LE fir-rigward tal-potenzjal ta' sustanza kimika li tikkaguna jew tinibixxi l-produzzjoni ta' T u E2; madankollu, jistgħu jinkisbu riżultati kwantitattivi f'ċerti każijiet (ara l-paragrafi 53 u 54). Ir-riżultati tal-assaġġ jingħataw bħala bidliet relattivi fil-produzzjoni tal-ormoni meta mqabbla mal-kontrolli ta' solventi (SCs). L-assaġġ ma għandux l-għan li jipprovdi informazzjoni mekkanistika speċifika dwar l-interazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mas-sistema endokrinali. Saret riċerka billi ntūzat il-linja ta' ċelloli halli jiġu identifikati effetti fuq enzimi speċifiċi u ormoni intermedjati bħall-proġestron (2).
3. Id-definizzjonijiet u t-taqsiriet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma deskritti fl-Appendiċi. Protokoll dettaljat inkludi struzzjonijiet dwar kif tipprepara soluzzjonijiet, tikkultura ċelloli u twettaq diversi aspetti tat-test huwa disponibbli bħala Appendiċi I-III tad-dokument tal-OECD 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4).

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

4. Hames enzimi differenti li jikkagunaw sitt reazzjonijiet differenti huma involuti f'bijosintezi tal-ormon tal-isterojdi tas-sess. Il-konverżjoni enzimatika tal-kolesterol għal pregnenolon miċ-ċitokromu P450 (CYP) enzima kolesterol monossigenasi li jaqta-katina laterali (CYP11 A) jikkostitwixxi l-pass inizjali f'serje ta' reazzjonijiet bijokimiċi li jwasslu għal sinteżi tal-prodotti finali tal-isterojdi. Skont l-ordni taż-żewġ reazzjonijiet ta' wara, il-mogħdija sterojdoġenika tinqasam f'żewġ mogħdijiet, il-mogħdija idrossisterojdi Δ^5 u l-mogħdija ketosterojdi Δ^4 , li jiltaqghu fil-produzzjoni tal-androstenedjon (Figura 1).
5. Androstenedjon huwa konvertit f'testosteron (T) minn 17 β -idrossisterojd deidrogenasi (17 β -HSD). It-testosteron huwa kemm prodott intermedjat kif ukoll ormon tal-prodott finali. Fir-raġel, T jista' jiġi konvertit f'diidrotestosteron (DHT) permezz ta' 5 α -ridottasi, li tinsab fil-membrani ċellolari, enve-lopp nukleari, u retikulu endoplazmiku tat-tessuti fil-mira ta' azzjoni androġenika bħall-prostata u n-nuffati seminali. DHT huwa notevolment iktar qawwi bħala androġen milli T u jitqies li huwa ormon tal-prodott finali wkoll. L-assaġġ H295R ma jkejilx id-DHT (ara l-paragrafu 10).

- Figura 1

```

graph TD
    Kolesterol -- CYP11A --> Pregnenolon
    Pregnenolon -- 3β-HSD --> Progesteron
    Pregnenolon -- CYP17 --> 17α-OH-Pregnenolon[17α-OH Pregnenolon]
    17α-OH-Pregnenolon -- 3β-HSD --> 17α-OH-Progesteron[17α-OH Progesteron]
    17α-OH-Progesteron -- CYP17 --> DHEA
    DHEA -- 3β-HSD --> Androstenedjon[Androstenedjon]
    Androstenedjon -- 17β-HSD --> Testosteron[Testosteron]
    Androstenedjon -- CYP19 --> Estron[Estron]
    Testosteron -- 17β-HSD --> 17β-estradiol[17β-estradiol]
    Estron -- 17β-HSD --> 17β-estradiol
    Progesteron -- CYP17 --> 17α-OH-Progesteron
    Progesteron -- CYP21 --> 11-deossikortikosteron[11-deossikortikosteron]
    11-deossikortikosteron -- CYP11B1/B2 --> Kortikosteron[Kortikosteron]
    Kortikosteron -- CYP11B2 --> Aldosteron[Aldosteron]
    17α-OH-Progesteron -- CYP21 --> Deossikortizol[Deossikortizol]
    Deossikortizol -- CYP11B1 --> Kortizol[Kortizol]
  
```

L-enĵimi huma fil-korsiv, l-ormoni huma skurati u l-vleġġ jindikaw id-direzzjoni tas-sintezi. L-isfond griż jindika mogħdijiet/prodotti kortikosterojdi. Il-mogħdijiet/prodotti sterojdi tas-sess għandhom ċirku madwarhom. CYP = ċitokroma P450; HSD = idrossisterojdi deidroġenasi; DHEA = deidroepiandrosteron.

8. Il-linja ta' ċelloli adreno-karċinoma H295R tal-bniedem hija mudell *in vitro* utli għall-investigazzjoni tal-effetti fuq sintezi tal-ormon sterojdi (2)(7)(8)(9)(10). Il-linja ta' ċelloli H295R tesprimi ġeni li jikkodifikaw għall-enżimi ewlenin kollha għall-isterojdoġenesi osservata iktar 'il fuq (11)(15) (Figura 1). Din hija proprjetà unika għaliex l-espressjoni *in vivo* ta' dawn il-ġeni hija speċifika għat-tessut u l-istadju tal-iżvilupp b'tipikament ebda tessut waħdu jew stadju tal-iżvilupp waħdu li jesprimi l-ġeni kollha involuti fl-isterojdoġenesi (2). Iċ-ċelloli H295R għandhom karatteristiċi

▼M5

fiżjoloġiċi ta' ċelloli adrenali ta' fetu tal-bniedem zonalment mhux differenzjati (11). Iċ-ċelloli jirrappreżentaw sistema *in vitro* unika peress li għandhom il-hila li jiproduċu l-ormoni sterojdi kollha fil-kortiċi adrenali adult u l-gonadi, biex b'hekk ikun jista' jsir ittestjar għal effetti kemm fuq sinteżi kortikosterojdi kif ukoll fuq il-produzzjoni tal-ormoni tal-isterojdi tas-sess bħal androġeni u estroġeni, għad li l-assaġġ kien validat biss biex jidentifika bidliet fit-T u E2. Il-bidliet irregistrati mis-sistema tat-test fil-forma ta' bidla fil-produzzjoni ta' T u E2 jistgħu jkunu ir-riżultat ta' firxa ta' interazzjonijiet differenti tas-sustanzi kimiċi tat-test b'funzjonijiet sterojdoġeniċi li huma espressi miċ-ċelloli H295R. Dawn jinkludu l-modulazzjoni tal-espressjoni, sinteżi jew funzjoni ta' enzimi involuti fil-produzzjoni, it-trasformazzjoni, jew l-eliminazzjoni ta' ormoni ta' sterojdi (12)(13)(14). L-inibizzjoni tal-produzzjoni ta' ormoni tista' tkun dovuta għal tagħqid kompetittiv dirett ma' enżema fil-mogħdija, impatt fuq kofatturi bħall-NADPH (Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat) u cAMP (Adenożina Monofosfat ċiklika), u/jew zieda fil-metaboliżmu tal-isterojdi jew it-trażzin tal-espressjoni tal-ġeni ta' ċerti enzimi fil-mogħdija tal-isterojdoġenesi. Filwaqt li l-inibizzjoni tista' tkun funzjoni kemm ta' proċessi diretti kif ukoll indetti involuti fil-produzzjoni ta' ormoni, normalment l-induzzjoni tkun ta' għamla indiretta, bħal permezz tal-effett fuq kofatturi bħall-NADPH u s-cAMP (bħal fil-każ ta' forskolin), tnaqqis fil-metaboliżmu tal-isterojdi (13), u/jew sopraregolamentazzjoni tal-espressjoni tal-ġeni sterojdoġeniċi.

9. L-assaġġ H295R għandu bosta vantaġġi:

- Jippermetti li jiġu identifikat kemm żidiet kif ukoll tnaqqisijiet fil-produzzjoni ta' T kif ukoll E2,
- Jippermetti li ssir valutazzjoni diretta tal-impatt potenzjali ta' sustanza kimika fuq il-vijabbiltà/iċ-ċitotossicità taċ-ċelloli. Din hija karatteristika importanti peress li b'hekk tkun tista' ssir diskriminazzjoni bejn l-effetti li huma dovuti għal ċitotossicità minn dawk dovuti għall-interazzjoni diretta tas-sustanzi kimiċi mal-mogħdijiet sterojdoġeniċi, li mhijiex possibbli f'sistemi ta' espjanti tat-tessut li jikkonsisti f'diversi tipi ta' ċelloli b'sensittivitajiet u funzjonalitajiet varji,
- Ma jehtieġx l-użu ta' annimali,
- Il-linja ta' ċelloli ta' H295R hija disponibbli b'mod kummerċjali.

10. Il-limitazzjonijiet ewlenin tal-assaġġ huma kif ġej:

- Il-kapaċità metabolika tiegħu mhijiex magħrufa iżda aktarx kemxejn limitata; b'hekk, sustanzi kimiċi li jehtieġu jkunu metabolikament attivi aktarx li mhux ser jinstabu f'dan l-assaġġ.
- Peress li ġej mit-tessut adrenali, H295R fih l-enzimi li kapaċi jiproduċu l-glukokortikojdi u l-mineralkortikojdi kif ukoll l-ormoni tas-sess; għalhekk, l-effetti fuq il-produzzjoni ta' glukokortikojdi u mineralkortikojdi jistgħu jinfluwenzaw il-livelli ta' T u E2 osservati fl-assaġġ,
- Ma jkejjiex DHT u, għalhekk, ma jkunx mistenni jsib sustanzi kimiċi li jinibixxu 5 α -ridottasi, f'liema każ jista' jintuza l-assaġġ Hershberger (16),
- L-assaġġ H295R mhuwiex ser jidentifika sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-isterojdoġenesi billi jaffettwaw l-assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG) peress li dan jista' jkun studjat biss f'annimali shah.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

11. L-iskop tal-assaġġ huwa l-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi li jaffettwaw il-produzzjoni ta' T u E2. T huwa wkoll intermedju fil-mogħdija għall-produzzjoni ta' E2. L-assaġġ jista' jidentifika sustanzi kimiċi li tipikament jinibixxu jew jinduċu l-enżimi tal-mogħdija tal-isterojdoġenesi.

▼ M5

12. Normalment l-assaġġ isir f'kundizzjonijiet standard tal-koltura taċ-ċelloli fi platti tal-koltura b'24 toqba. Inkella, jistghu jintużaw daqsijiet oħrajn tal-platti għat-tweġġ tal-assaġġ; madankollu, kundizzjonijiet taz-żriegħ u sperimentali għandhom jiġu aġġustati kif xieraq biex tinżamm aderenza mal-kriterji tal-prestazzjoni.
13. Wara perjodu ta' akklimatizzazzjoni ta' 24 siegħa fi platti b'bosta toqob, iċ-ċelloli jiġu esposti għal 48 siegħa għal seba' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'tal-inqas tripilikat. Solvent u inibitur u induttur magħruf tal-produzzjoni tal-ormoni jintużaw b'konċentrazzjoni fissa bħala kontrolli negattivi u pozittivi. Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment, il-midjum jitneħħa minn kull toqba. Il-varjabbiltà taċ-ċelloli f'kull toqba tiġi analizzata eżatt wara t-neħħija tal-midjum. Il-konċentrazzjonijiet tal-ormoni fil-midjum jistghu jitkejlu permezz ta' firxa ta' metodi inkluzi kits ta' kejl tal-ormoni kummerċjalment disponibbli u/jew tekniki strumentali bħal spettrometrja tal-massa tal-kromatografija likwida (LC-MS). Id-dejta tingħata bħala bidla fid-daqs relatata mal-kontroll tas-solvent u l-Inqas Konċentrazzjoni b'Effett Osservata (LOEC). Jekk l-assaġġ ikun negattiv, l-oghla konċentrazzjoni ttestjata tiġi rrapportata bħala l-Konċentrazzjoni bl-Ebda Effett Osservat (NOEC). Konkluzjonijiet dwar il-hila ta' sustanza kimika biex taffettwa l-isterojdoġenesi għandhom ikunu bbażati fuq tal-inqas żewġ testijiet indipendenti. L-ewwel test jista' jahdem bħala test ta' sejbien tal-medda b'aġġustament sussegwenti tal-konċentrazzjonijiet għat-testijiet 2 u 3, jekk applikabbli, jekk jinstabu problemi relatati mas-solubilità jew iċ-ċitotossicità jew jekk l-attività tas-sustanza kimika tkun tidher li waslet fi tmiem il-medda tal-konċentrazzjonijiet ittestjati.

PROCEDURA TAL-KOLTURA

Linja Ċellolari

14. Iċ-ċelloli NCI-H295R huma kummerċjalment disponibbli mill-American Type Culture Collections (ATCC) wara li jiġi ffirmat Material Transfer Agreement (MTA) ⁽¹⁾.

Introduzzjoni

15. Minhabba bidliet fil-kapaċità ta' produzzjoni ta' E2 taċ-ċelloli b'età/mogħdija li jikbru (2), iċ-ċelloli għandhom ikunu kulturati wara protokoll speċifiku qabel jintużaw u għandha tittiehed nota tan-numru ta' mogħdijiet mindu iċ-ċelloli tneħħew mill-friza kif ukoll in-numru tal-mogħdija li fiha gew iffriżati iċ-ċelloli u tqiegħdu f'hażna tan-nitroġenu likwidu. L-ewwel numru jindika n-numru tal-mogħdija propja taċ-ċellola u t-tieni numru jiddeskrivi n-numru tal-mogħdija li fiha iċ-ċelloli gew iffriżati u tqiegħdu għall-ħzin. Pereżempju, ċelloli li kienu iffriżati wara l-hames mogħdija u tneħħew mill-friza u mbagħad inqasmu tliet darbiet (4 mogħdijiet jekk iċ-ċelloli mahlul frisk jingħaddu bħala l-1 mogħdija) wara li gew ikkolturati mill-ġdid jitnizzlu bħala l-mogħdija 4.5. Eżempju ta' skema ta' enumerar hija rappreżentata fl-Appendiċi I tar-rapport ta' validazzjoni (4).
16. Midjum tal-hażna jintuża bħala l-bażi għall-midjums supplimentati u tal-iffriżar. Il-midjum supplimentat huwa komponent neċessarju għall-koltura taċ-ċelloli. Il-midjum tal-iffriżar huwa mfassal b'mod speċifiku biex ikun jista' jsir iffriżar hieles minn impatti taċ-ċelloli għal ħzin fit-tul. Qabel l-użu, Nu-serum (jew serum komparabbli bi proprjetajiet indaqs li ntwera li jipproduċi dejta li tissodisfa l-prestazzjoni tat-test u r-rekwiżiti ta' Kontroll tal-Kwalità (QC)), li huwa kostitwent ta' midjums supplimentati, għandu jiġi analizzat għal konċentrazzjonijiet ta' sfond ta' T u E2. Il-preparazzjoni ta' dawn is-soluzzjonijiet hija deskritta fl-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4).

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

▼ M5

17. Wara l-bidu tal-koltura ta' ċellola H295R minn lott oriġinali tal-ATCC, iċ-ċelloli għandhom jitkabbru għal hames moghdijiet (jiġifieri iċ-ċelloli jinqasnu 4 darbiet). Imbagħad, iċ-ċelloli tal-hames moghdija jiġu ffrizati f'nitroġenu likwidu għall-ħzin. Qabel l-iffriżar taċ-ċelloli, fi platt tal-QC isir kampjun taċ-ċelloli tar-raba' moghdija preċedenti (Ara l-paragrafu 36 u 37) biex jiġi verifikat jekk il-produzzjoni bażi tal-ormoni u r-rispons għal sustanzi kimiċi tal-kontroll pżittiv jissodisfawx il-kriterji ta' kontroll tal-kwalità tal-assaġġ kif definiti fit-Tabella 5.
18. Iċ-ċelloli H295R iridu jiġu kkulturati, iffriżati u jinħażnu f'nitroġenu likwidu biex jiġi żgurat li dejjem ikun hemm ċelloli tal-moghdija/età xierqa disponibbli għal koltura u użu. In-numru massimu ta' moghdijiet wara li jittiehed lott gdid ⁽¹⁾ jew iffriżat ⁽²⁾ ta' ċelloli f'koltura li huwa aċċettabbli għall-użu fl-assaġġ H295R ma għandux jaqbeż l-10. Pereżempju, il-moghdijiet aċċettabbli għall-kolturi ta' ċelloli minn lott iffriżat fil-moghdija 5 ikun minn 4.5 sa 10.5. Għal ċelloli li jinbdew minn dawn il-lottijiet iffriżati, għandha tiġi segwita l-proċedura deskritta fil-paragrafu 19. Dawn iċ-ċelloli għandhom jiġu kkulturati għal tal-inqas erba' (4) moghdijiet addizzjonali (moghdija 4.5) qabel ma jintużaw fl-ittestjar.

Ċelloli tal-Bidu mill-Hażna Ffrizata

19. Il-proċedura għall-bidu taċ-ċelloli minn hażna ffrizata għandha tintuża meta lott gdid ta' ċelloli jitneħħa mill-ħzin f'nitroġenu likwidu għall-fini ta' koltura u ttestjar. Id-dettalji għal din il-proċedura huma stabbiliti fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4). Iċ-ċelloli jitneħħew minn hażna f'nitroġenu likwidu, jinħallu malajr, jitqiegħdu f'midjum supplimentat f'tubu ċentrifugu f'temperatura ambjentali, jergġhu jiġu sospizi f'midjum supplimentat, u jiġu ttrasferiti fi flask tal-koltura. Il-midjum għandu jinbidel l-għada. Iċ-ċelloli H295R huma kolativati f'inkubatur f'37 °C b'5 % CO₂ f'atmosfera tal-arja u l-midjum jinbidel 2-3 darbiet fil-gimgha. Meta iċ-ċelloli jkunu madwar 85-90 % konfluwenti, għandhom jinqasnu. Il-qsim taċ-ċelloli huwa neċessarju biex jiġu żgurati s-saħħa u t-tkabbir taċ-ċelloli u sabiex jinżammu ċelloli għat-twertiq ta' bjoassaggi. Iċ-ċelloli jitlaħhalu tliet darbiet b'salmastru b'bafer tal-fosfat (PBS, bla Ca²⁺ Mg²⁺) u jitneħħew mill-flask tal-koltura billi tiżdied enzima xierqa ta' qluġh, eż., tripsina, f'PBS (bla Ca²⁺ Mg²⁺). Ezatt wara li iċ-ċelloli jinqalghu mill-flask tal-koltura, l-azzjoni tal-enzima għandha titwaqqaf billi jiżdied il-midjum supplimentat bi proporzjon ta' 3X il-volum użat għat-trattament bl-enzima. Iċ-ċelloli jitqiegħdu f'tubu ċentrifugu, jiġu ċentrifugati f'temperatura ambjentali, is-supernatant jitneħħa u l-pellet ta' ċelloli jerga' jiġi sospiz f'midjum supplimentat. L-ammont xieraq ta' soluzzjoni taċ-ċellola jitqiegħed fil-flask il-gdid tal-koltura. L-ammont ta' soluzzjoni taċ-ċellola għandu jiġi agġustat sabiex iċ-ċelloli jkunu konfluwenti fi żmien 5-7 ijiem. Il-proporzjon sottokultivat rakkomandat huwa 1:3 sa 1:4. Il-platt għandu jiġi mmarkat bir-reqqa. Iċ-ċelloli issa lseti biex jintużaw fl-assaġġ u iċ-ċelloli zejda għandhom jiġu ffrizati f'nitroġenu likwidu kif spjegat fil-paragrafu 20.

⁽¹⁾ "Lott gdid" tirreferi għal lott fjamant ta' ċelloli riċevut mill-ATCC.

⁽²⁾ "Lott iffriżat" tirreferi għal ċelloli li ġew ikkulturati qabel u mbagħad ġew iffriżati fl-laboratorju iehor li mhuwiex l-ATCC.

▼ **M5****Iffriżar ta' Ċelloli H295R (preparazzjoni ta' ċelloli għal ħzin f'nitroġenu likwidu)**

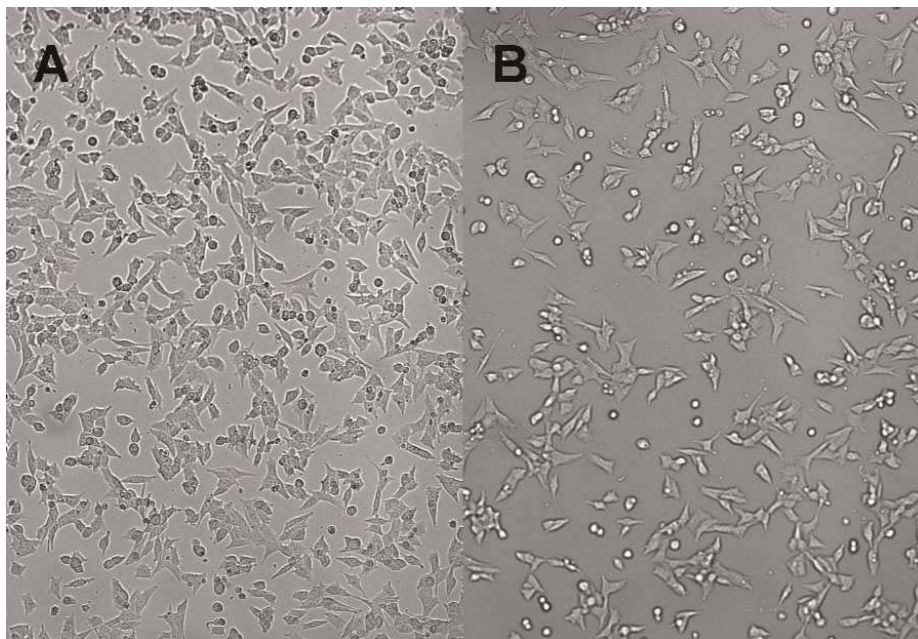
20. Biex jiġu ppreparati ċelloli H295R għall-iffriżar, il-proċedura deskritta hawn fuq għall-qsim ta' ċelloli għandha tiġi segwita sal-istadju ta' sospensjoni mill-ġdid tal-pellet ta' ċelloli f'qiegħ it-tubu ċentrifugu. Hawnhekk, il-pellet ta' ċelloli jerga' jiġi sospiz f'midjum ta' ffrizjar. Is-soluzzjoni tiġi ttrasferita f'kunjett krijoġeniku, immarkata kif xieraq, u ffrizata f' -80°C għal 24 siegħa u wara l-kunjett krijoġeniku jiġi ttrasferit f'nitroġenu likwidu għall-ħzin. Id-dettalji għal din il-proċedura huma stabbiliti fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4).

Tqegħid fil-Platti u Preinkubazzjoni ta' Ċelloli għall-Ittestjar

21. In-numru ta' platti b'24 toqba, ippreparati kif spjegat fil-paragrafu 19, li ser ikunu meħtieġa skont in-numru ta' sustanzi kimiċi li għandhom jiġu ttestjati u l-konfluwenza ta' ċelloli fil-platti tal-kultura. Bħala regola ġenralli, flask wieħed tal-kultura (75 cm^2) b'ċelloli konfluwenti ta' 80-90 % ser iforni bizzejjed celloli għal platt wieħed sa 1,5 (b'24 toqba) b'densità fil-mira ta' 200 000 sa 300 000 ċellola għal kull ml tal-midjum, u dan jirriżulta f'konfluwenza ta' madwar 50-60 % fit-toqob wara 24 siegħa (Figura 2). Tipikament, din hija d-densità ottimali ta' ċelloli għall-produzzjoni ta' ormoni fl-assaġġ. F'densitajiet oghla, il-mudelli ta' produzzjoni ta' T kif ukoll E2 jinbidlu. Qabel ma jsir l-assaġġ għall-ewwel darba, huwa rakkomandat li jiġu ttestjati densitajiet ta' żriegħ differenti ta' bejn 200 000 u 300 000 ċellola għal kull ml, u li d-densità li tirriżulta f'konfluwenza ta' 50-60 % fit-toqba wara 24 siegħa tingħazal għal iktar esperimenti.

Figura 2

Fotomikrografija ta' ċelloli H295R b'densità ta' żriegħ ta' 50 % fi platt tal-kultura b'24 toqba meħuda fit-tarf (A) u ċ-ċentru (B) ta' toqba



22. Il-midjum jiġi pipettat mill-flask tal-kultura, u ċ-ċelloli jitlaħhalu 3 darbiet b'PBS sterili (bla Ca^{2+} u Mg^{2+}). Tizdied soluzzjoni ta' enżima (f'PBS) biex taqla' ċ-ċelloli mill-flask tal-kultura. Wara żmien xieraq għall-qluġ ta' ċelloli, l-azzjoni tal-enżima għandha titwaqqaf biż-żieda ta' midjum supplimentat bi proporzjon ta' 3X il-volum użat għat-trattament bl-enżima. Iċ-ċelloli jitqiegħdu f'tubu ċentrifugu, ċentrifugati f'temperatura ambjentali, is-supernatant jitneħħa, u l-pellet ta' ċelloli jerga' jiġi sospiz f'midjum

▼ M5

supplimentat. Id-densità taċ-ċelloli tiġi kkalkolata billi jintużaw, eż., emoċi-tometru jew kalkolatur taċ-ċelloli. Is-soluzzjoni taċ-ċelloli għandha tiġi dilwita sad-densità mixtieqa tat-tqeghid fil-platt u tithawwad sew biex tiġi żgurata densità omoġena taċ-ċelloli. Iċ-ċelloli għandhom jitqiegħdu fi platt b'1 ml tas-soluzzjoni ta' ċelloli/toqba u l-platti u t-toqob immarkati. Il-platti li fihom isir żriegħ jiġu inkubati f'37 °C f'5 % CO₂ f'atmosfera tal-ajru għal 24 siegħa biex iċ-ċelloli jkunu jistgħu jaqbd u mat-toqob.

REKWIŻITI TA' KONTROLL TAL-KWALITÀ

23. Huwa kruċjali li l-volumi eżatti tas-soluzzjonijiet u l-kampjuni jitwasslu fit-toqob matul id-dożagġ għaliex dawn il-volumi jiddeterminaw il-konċentrazzjonijiet użati fil-kalkoli tar-riżultati tal-assaġġ.
24. Qabel il-bidu tal-kultura taċ-ċelloli u kwalunkwe ttestjar sussegwenti, kull laboratorju għandu juri s-sensittività tas-sistema ta' kejl tal-ormoni tagħha (paragrafi 29-31).
25. Jekk ser jintużaw assaġġi ta' kejl tal-ormoni bbażati fuq antikorpi, is-sustanzi kimiċi li ser jiġu ttestjati għandhom jiġu analizzati għall-potenzjal tagħhom li jinterferixxu mas-sistema ta' kejl użata biex jiġu kwantifikati T u E2 kif spjegat fil-paragrafu 32 qabel jinbeda l-ittestjar.

26. DMSO huwa s-solvent rakkomandat għall-assaġġ. Jekk jintuża solvent alternattiv, għandhom jiġu determinati dawn li ġejjin:

— Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test, il-forskolin u l-prokloraz fis-solvent, u

— Iċ-ċitotossità bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni tas-solvent.

Huwa rakkomandat li l-konċentrazzjoni massima awtorizzabbli tas-solvent ma għandhiex taqbeż $10 \times$ dilwizzjoni tal-inqas konċentrazzjoni ċitotossika tas-solvent.

27. Qabel ma jagħmel it-testijiet għall-ewwel darba, il-laboratorju għandu jagħmel esperiment kwalifikattiv li juri li l-laboratorju kapaċi jżomm u jilhaq il-kundizzjonijiet xierqa meħtieġa tal-kultura taċ-ċelloli u tal-esperimenti għall-ittestjar tas-sustanza kimika kif spjegat fil-paragrafi 33-35.
28. Meta jinbeda l-ittestjar għal lott ġdid, għandu jsir platt tal-kontroll qabel ma jintuża lott ġdid ta' ċelloli halli tiġi evalwata l-prestazzjoni taċ-ċelloli kif deskritt fil-paragrafi 36 u 37.

Prestazzjoni tas-Sistema ta' Kejl tal-Ormoni

Sensittività, reqqa, preċiżjoni tal-metodu u l-kontrollareattività tiegħu ma' matriċi kampjun

29. Kull laboratorju jista' juża sistema ta' kejl tal-ormoni tal-għażla tiegħu għall-analizi tal-produzzjoni ta' T u E2 minn ċelloli H295R diment li tissodisfa l-kriterji ta' prestazzjoni, inkluż il-imitu ta' Kwantifikazzjoni (LOQ). Nominalment, dawn huma 100 pg/ml għal T u 10 pg/ml għal E2, li huma bbażati fuq il-livelli ormonali bażi fl-istudji ta' validazzjoni. Madankollu, livelli oġġla jew inqas jistgħu jkunu xierqa skont il-livelli tal-ormoni bażi miksubin fil-laboratorju inkarigat. Qabel ma jsiru l-platti tal-QC u t-testijiet, il-laboratorju għandu juri li l-assaġġ tal-ormon li ser jintuża jista' jkejjel konċentrazzjonijiet tal-ormoni f'midjum supplimentat b'reqqa u preċiżjoni

▼ M5

suffiċjenti sabiex jissodisfa l-kriterji tal-QC speċifikati fit-Tabelli 1 u 5 billi jiġi analizzat midjum supplimentat miżjud b'kontroll intern tal-ormoni. Ma' kull midjum supplimentat għandhom jiżdiedu tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet ta' kull ormon (eż., 100, 500 u 2 500 pg/ml T; 10, 50 u 250 pg/ml E2; jew l-inqas konċentrazzjonijiet possibbli fuq il-bażi tal-limiti ta' identifikazzjoni tas-sistema ta' kejl tal-ormoni magħżulin jistgħu jintużaw għall-inqas konċentrazzjonijiet miżjudin għal T u E2) u jiġu analizzati. Konċentrazzjonijiet tal-ormoni mkejl ta' kampjuni mhux estrattati għandhom ikunu fi hdan konċentrazzjonijiet nominali ta' 30 %, u l-varjazzjoni ta' bejn il-kejliet replikati tal-istess kampjun ma għandhiex taqbeż il-25 % (ara wkoll it-Tabella 8 għal kriterji addizzjonali tal-QC). Jekk dawn il-kriterji tal-QC jiġu ssodisfati, huwa supponut li l-assaġġ magħżul tal-kejl tal-ormoni huwa eżatt u preċiż biżżejjed u ma jidholx f'kontrollazzjoni ma' komponenti fil-midjum (matriċi kampjun) b'tali mod li tkun mistennija influwenza importanti fuq l-eżitu tal-assaġġ. F'dan il-każ, ma jkun hemm bżonn li ssir ebda estrazzjoni ta' kampjuni qabel il-kejl tal-ormoni.

30. F'każ li l-kriterji tal-QC fit-tabelli 1 u 8 ma jkunux issodisfati, jista' jkun li qed isehh effett matriċi sinifikanti, u għandu jsir esperiment b'midjum miżjud estratt. Eżempju ta' proċedura ta' estrazzjoni huwa deskritt fl-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4). Il-kejl tal-konċentrazzjonijiet ta' ormini fil-kampjuni estrattati għandhom isiru tliet darbiet⁽¹⁾. Jekk jista' jintwera li wara l-estraxxjoni l-komponenti tal-midjum ma jinterferixxux mal-metodu ta' identifikazzjoni tal-ormon kif definit mill-kriterji tal-QC, l-esperimenti kollha li jsiru wara għandhom isiru billi jintużaw kampjuni estrattati. Jekk il-kriterji tal-QC ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati wara l-estraxxjoni, is-sistema ta' kejl tal-ormoni użata mhijeix xierqa għall-fini tal-Assaġġ tal-Isterojdoġenesi H295R, u għandu jintuża metodu alternattiva ta' identifikazzjoni tal-ormoni.

Kurva standard

31. Il-konċentrazzjonijiet tal-ormoni tal-kontrolli tas-solvent (SC) għandhom ikunu jaqgħu fi hdan is-sehem lineari tal-kurva standard. Idealment, il-valuri tal-SC għandhom ikunu jaqgħu hdejn in-nofs tas-sehem lineari biex jiġi żgurat li l-induzzjoni u l-inibizzjoni tas-sinteżi tal-ormoni jistgħu jitkejlu. Id-dilwizzjonijiet tal-midjum (jew estratti) li għandhom jitkejlu jridu jingħazlu kif xieraq. Ir-reazzjoni lineari trid tiġi determinata permezz ta' approċċ statistiku.

Test tal-interferenza kimika

32. Jekk ser jintużaw assaġġi bbażati fuq antikorpi bħal Assaġġi Immunosorbenti Marbutin mal-Enżimi (ELISAs) u Assaġġi Radjuimmuni (RIAs) biex jitkelju l-ormoni, kull sustanza kimika għandha tiġi ttestjata għal interferenza potenzjali mas-sistema ta' kejl tal-ormoni li ser tintuża qabel jinbada l-ittestjar propju tas-sustanzi kimiċi (Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4)) għaliex uħud mill-karatteristiċi jistgħu jinterferixxu ma' dawn it-testijiet (17). Jekk issehħ interferenza li hija ≥ 20 % tal-produzzjoni tal-ormoni bażi għal T u/jew E2 kif determinat mill-analiżi tal-ormoni, it-Test ta' Interferenza tal-Assaġġ tal-Ormoni mas-Sustanza Kimika (kif deskritt fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4) taqsima 5.0) għandu jsir fuq id-dilwizzjonijiet kollha tas-soluzzjonijiet tal-ħażna tas-sustanza kimika tat-test halli

⁽¹⁾ Nota: Jekk ikun hemm bżonn estrazzjonijiet, isiru tliet kejljet identiċi għal kull estratt. Kull kampjun ser jiġi estrattat darba biss.

▼ M5

jigi identifikat id-doża limitu li biha ssehh interferenza sinifikanti ($\geq 20\%$). Jekk l-interferenza hija inqas minn 30% , ir-riżultati jistghu jigu kkoreġuti għall-interferenza. Jekk l-interferenza taqbeż it- 30% , id-dejta tkun invalida u għandha titwarrab id-dejta f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Jekk issehh interferenza sinifikanti ta' sustanza kimika tat-test ma' sistema ta' kejl tal-ormoni f'iktar minn konċentrazzjoni mhux ċitotossika waħda, għandha tintuża sistema differenti ta' kejl tal-ormoni. Sabiex tiġi evitata interferenza minn sustanzi kimiċi kontaminanti, huwa rakkomandat li l-ormoni jigu estrattati mill-midjum permezz ta' solvent xieraq, il-metodi possibbli jistghu jinkisbu mir-rapport ta' validazzjoni (4).

Tabella 1

Kriterji ta' prestazzjoni tas-sistemi ta' kejl tal-ormoni

Parametru	Kriterju
Sensittività tal-Metodu ta' Kejl	Limitu tal-Kwantifikazzjoni (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Effiċjenza tal-Estrazzjoni tal-Ormoni (biss meta jkun hemm bżonn estrazzjoni)	Ir-rati medji ta' rkupru (fuq il-bażi ta' miżuri tripli) għall-ammonti miżjudin tal-ormon ma għandhomx imorru oltre 30% mill-ammont li żdied.
Interferenza Kimika (sistemi bbażati fuq l-antikorp biss)	Ma għandha ssehh ebda kontroreattività sostanzjali ($\geq 30\%$ tal-produzzjoni tal-ormon bażi tal-ormon rappreżentattiv) ma' kwalunkwe wieħed mill-ormoni prodotti miċ-ċelloli ^(b) ^(c)

^(a) Nota: Il-limiti ta' mmanigġjar tal-metodi huma bbażati fuq il-valuri ta' produzzjoni tal-ormon bażi pprovduti fit-Tabella 5 u huma bbażati fuq il-prestazzjoni. Jekk tista' tinkiseb produzzjoni ikbar tal-ormon bażi, il-limitu jista' jkun ikbar.

^(b) Certi antikorp ta' T u E2 jistghu jagħmlu kontroreazzjoni ma' androstendjon u estron, rispettivament, f'perċentwal oghla. F'dawn il-kazijiet, mhuwiex possibbli li jigu determinati bi preċiżjoni l-effetti fuq 17β -HSD. Madankollu, id-dejta xorta tista' tipprovi tagħrif utli dwar l-effetti fuq il-produzzjoni ta' estrogen jew androgen ingenerali. F'dawn il-kazijiet, id-dejta għandha tingħata bħala risponsi tal-androgen/estrogen flok E2 u T.

^(c) Dawn jinkludu: kolesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deossikortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17α -pregnenolon, 17α -progesteron, deossikortizol, kortizol, DHEA, androstenedjon, estron.

Test tal-Profiċjenza tal-Laboratorju

33. Qabel ma jigu ttestjati sustanzi kimiċi mhux magħrufin, laboratorju għandu juri li kapaċi jikseb u jżomm kundizzjonijiet xierqa għall-kultura taċ-ċelloli u t-testijiet meħtieġa għat-twettiq b'suċċess tal-assaġġ billi jagħmel test tal-profiċjenza tal-laboratorju. Peress li t-twettiq ta' assaġġ huwa marbut direttament mal-persunal tal-laboratorju li jwettaq l-assaġġ, dawn il-proċeduri għandhom jigu parzjalment ripetuti jekk issehh bidla fil-persunal tal-laboratorju.
34. Dan it-test tal-profiċjenza ser isir fl-istess kundizzjonijiet elenkati fil-paragrafi 38 sa 40 billi ċ-ċelloli jigu esposti għal 7 konċentrazzjonijiet li jiżdiedu ta' indutturi u inibituri qawwjin, moderati u dgħajfin kif ukoll sustanza kimika negattiva (ara t-Tabella 2). B'mod speċifiku, is-sustanzi kimiku li għandhom jigu ttestjati jinkludu l-induttur b'saħħtu forskolin (Nru tas-CAS 66575-29-9); l-inibitur b'saħħtu prokloraz (Nru tas-CAS 67747-09-5); l-induttur moderat atrazina (Nru tas-CAS 1912-24-9); l-inibitur moderat aminoglutetimid (Nru tas-CAS 125-84-8); l-induttur dgħajef (produttjoni ta' E2) u inibitur dgħajef (produttjoni ta' T) bisfenol

▼ **M5**

A (Nru tas-CAS 80-05-7); u l-gonadotropina korjonika umana tas-sustanza kimika negattiva (HCG) (Nru tas-CAS 9002-61-3) kif muri fit-Tabella 2. Isiru platti separati ghas-sustanzi kimiċi kollha billi jintuza l-format kif muri fit-Tabella 6. Platt tal-QC minnhom (Tabella 4, paragrafi 36-37) għandu jkun inkluz fit-test ta' kuljum ghas-sustanzi kimiċi tal-profiċjenza.

Tabella 2:

Sustanzi kimiċi tal-profiċjenza u konċentrazzjonijiet ta' esponiment

Sustanza kimika tal-profiċjenza	Konċentrazzjonijiet tat-Test [μ M]
Prokloraz	0 ^(a) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atrazina	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimid	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(a) Kontroll tas-solvent (DMSO) (0), 1 μ l DMSO/toqba

L-esponiment ta' H295R għal sustanzi kimiċi tal-profiċjenza għandha ssir fi platti b'24 toqba matul it-test tal-profiċjenza tal-laboratorju. Id-dożaġġ huwa f' μ M għad-dożi kollha tas-sustanza kimika tat-test. Id-dożi għandhom jingħataw f'DMSO b'0,1 % v/v għal kull toqba. Il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test għandhom jiġu ttestjati f'toqob tripli (Tabella 6). Platti separati jiġu ttestjati għal kull sustanza kimika. Platt tal-QC minnhom huwa inkluz ma' kull test ta' kuljum.

35. L-analizi tal-vijabbiltà taċ-ċellola u tal-ormon għandha ssir kif stipulat fil-paragrafi 42 sa 46. Il-valur limitu (l-inqas konċentrazzjoni b'effett osservata, LOEC) u d-deċiżjoni ta' klassifikazzjoni għandhom jiġu rrapportati u jitqabblu mal-valuri fit-Tabella 3. Id-dejta titqies aċċettabbli jekk tissodisfa l-LOEC u l-klassifikazzjoni tad-deċiżjoni fit-Tabella 3.

Tabella 3:

Valuri limitu (LOECs) u klassifikazzjonijiet tad-deċiżjoni ghas-Sustanzi Kimiċi tal-Profiċjenza

	Nru tas-CAS	LOEC [μ M]		Klassifikazzjoni tad-Deciżjoni	
		T	E2	T	E2
Prokloraz	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (Inibizzjoni)	+ (Inibizzjoni)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (Induzzjoni)	+ (Induzzjoni)
Atrazina	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Induzzjoni)	+ (Induzzjoni)
Aminoglutetimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inibizzjoni)	+ (Inibizzjoni)

▼ M5

	Nru tas-CAS	LOEC [μ M]		Klassifikazzjoni tad-Deċizzjoni	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inibizzjoni)	+ (Induzzjoni)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negattiva	Negattiva

(^a) +, pożittiva

n/a: mhux applikabbli peress li ma għandha ssehh ebda bidla wara esponiment għal konċentrazzjonijiet mhux ċitotossici tal-kontroll negattiv.

Platti tal-Kontroll tal-Kwalità

36. Il-platt tal-kontroll tal-kwalità (QC) jintuża biex tiġi verifikata l-prestazzjoni taċ-ċelloli H295R f'kundizzjonijiet standard tal-kultura, u biex tiġi stabbilita database storika għal konċentrazzjonijiet ta' ormoni f'kontrolli solventi, kontrolli pożittivi u negattivi, kif ukoll kejl oħrajn tal-QC maż-żmien.

— Il-prestazzjoni taċ-ċelloli H295R għandha tiġi vvalutata billi jintuża platt tal-QC għal kull lott ġdid mill-ATCC jew wara li tintuża hażna ffrizata qabel ta' ċelloli għall-ewwel darba sakemm ma jkunx sar test tal-profiċjenza tal-laboratorju (paragrafi 32-34) b'dak il-lott ta' ċelloli,

— Platt tal-QC jipprovdli valutazzjoni shiha tal-kundizzjonijiet tal-assaġġ (eż., il-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-kontrolli tas-solvent, il-kontrolli negattivi u pożittivi, kif ukoll il-varjabbiltà intra u interassaġġi) meta jiġu ttestjati s-sustanzi kimiċi u għandu jkun parti minn kull test.

37. It-test tal-QC isir fi platt b'24 toqba u jsegwi l-istess proċeduri ta' inkubazzjoni, dożaġġ, vijabbiltà/ċitotossicità taċ-ċelloli, estrazzjoni tal-ormon u analiżi tal-ormon deskritti fil-paragrafi 38 sa 46 għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi. Il-platt tal-QC fih vojta, kontrolli tas-solvent, u żewġ konċentrazzjonijiet ta' induttur magħruf (forskolin, 1, 10 μ M) u inibitur (prokloraz, 0,1, 1 μ M) tas-sinteti ta' E2 u T. Barra minn hekk, MeOH jintuża f'toqob magħżulin bħala kontroll pożittiv għall-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossicità. Deskrizzjoni dettallata tat-tifsila tal-platt hija pprovdta fit-Tabella 4. Il-kriterji li għandhom jiġu ssodisfati fil-platt tal-QC huma elenkati fit-Tabella 5. Il-produttjoni minima tal-ormon bażi għal T u E2 għandha tiġi ssodisfata kemm fil-kontroll tas-solvent kif ukoll fit-toqob vojta.

Tabella 4

Tifsira tal-platt tal-kontroll tal-kwalità għall-ittestjar tal-prestazzjoni ta' ċelloli H295R mhux esposti u ċelloli esposti għal inibituri magħrufin (PRO = prokloraz) u stimulatori (FOR = forskolin) tal-produttjoni ta' E2 u T. Wara li jintemm l-esperiment ta' esponiment u jitneħħa l-midjum, ser tiżdied soluzzjoni ta' metanol ta' 70 % mat-toqob kollha ta' MeOH biex isservi ta' kontroll pożittiv għaċ-ċitotossicità (ara l-assaġġ taċ-ċitotossicità fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Vojta (^a)	Vojta (^a)	Vojta (^a)	Vojta (^a) (+ MeOH) (^b)	Vojta (^a) (+ MeOH) (^b)	Vojta (^a) (+ MeOH) (^b)
B	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μ M	FOR 1 μ M	FOR 1 μ M	PRO 0,1 μ M	PRO 0,1 μ M	PRO 0,1 μ M
D	FOR 10 μ M	FOR 10 μ M	FOR 10 μ M	PRO 1 μ M	PRO 1 μ M	PRO 1 μ M

(a) Ċelloli f'toqob Vojta jirċievu midjum biss (jiġifieri ebda solvent).

(b) Metanol (MeOH) ser jiżdied **wara** li jintemm l-esponiment u l-midjum jitneħħa minn dawn it-toqob.

(c) Kontroll tas-solvent tad-DMSO (1 μ l/toqba).

Tabella 5

Kriterji tal-prestazzjoni għall-Platt tal-Kontroll tal-Kwalità

	T	E2
Produzzjoni bażi ta' ormon fil-kontroll solvent (SC)	≥ 5 darbiet l-LOQ	$\geq 2,5$ darbiet l-LOQ
Induzzjoni (10 μ M forskolin)	$\geq 1,5$ darbiet l-SC	$\geq 7,5$ darbiet l-SC
Inibizzjoni (1 μ M prokloraz)	$\leq 0,5$ darbiet l-SC	$\leq 0,5$ darbiet l-SC

PROCEDURA TA' ESPONIMENT GĦAL SUSTANZA KIMIKA

38. Iċ-ċelloli preinkubati jitneħħew mill-inkubatur (paragrafu 21) u jiġu kkontrollati taħt mikroskopju biex jiġi żgurat li huma f'kundizzjoni tajba (kemm qabdu, il-morfoloġija) qabel id-dożaġġ.
39. Iċ-ċelloli jitqiegħdu f'kabina tal-bijosikurezza u l-midjum supplimentat jitneħħa u jinbidel ma' midjum supplimentat ġdid (1 ml/toqba). DMSO huwa s-solvent ippreferut għal dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, jekk hemm raġunijiet sabiex jintużaw solventi oħrajn, għandha tiġi deskritta r-raġuni xjentifika. Iċ-ċelloli huma esposti għas-sustanza kimika ta' ttestjar b'żieda ta' 1 μ l tas-soluzzjoni tal-ħażna xierqa fid-DMSO (ara l-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4)) għal kull 1 ml midjum supplimentat (volum tat-toqba). Dan jirriżulta f'konċentrazzjoni finali ta' 0,1 % DMSO fit-toqob. Biex jiġi żgurat tahlit adegwat, ġeneralment huwa ppreferut li s-soluzzjoni tal-ħażna xierqa tas-sustanza kimika tat-test fid-DMSO titħallat ma' midjum supplimentat biex tinkiseb il-konċentrazzjoni finali mixtieqa għal kull doża, u t-tahlita tizdied ma' kull toqba eżatt wara t-tneħħija tal-midjum il-qadim. Jekk tintuża din l-għażla, il-konċentrazzjoni tad-DMSO (0,1 %) għandha tibqa' konsistenti bejn it-toqob kollha. It-toqob li fihom l-ikbar żewġ konċentrazzjonijiet jiġu vvalutati viżwalment għal formazzjoni ta' preċipitati jew dardir bħala indikazzjoni ta' solubilità inkompluta tas-sustanza kimika tat-test billi jintuża sterjomikroskopju. Jekk jiġu osservati dawn il-kundizzjonijiet (dardir, formazzjoni ta' preċipitati), it-toqob li fihom l-inqas konċentrazzjonijiet li jmiss jiġu eżaminati wkoll (u l-bqija) u l-konċentrazzjonijiet li ma ddahhlux kompletament fis-soluzzjoni għandhom jiġu esklużi minn evalwazzjoni u analiżi ulterjuri. Il-platt jittiehed lura fl-inkubatur f'37 °C f'5 % CO₂ f'atmosfera tal-arja għal 48 siegħa. It-tifsila tal-platt tas-sustanza kimika tat-test tintwera fit-Tabella 6. Il-ħażniet 1 -7 juru tfassil b'dożijiet li jiżdiedu tas-sustanza kimika tat-test.

▼M5

Tabella 6

Skematika tad-dożaġġ għall-esponiment ta' ċelloli H295R biex jiġu ttestjati sustanzi kimiċi fi platt b'24 toqba

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Hażna 4	Hażna 4	Hażna 4
B	Hażna 1	Hażna 1	Hażna 1	Hażna 5	Hażna 5	Hażna 5
C	Hażna 2	Hażna 2	Hażna 2	Hażna 6	Hażna 6	Hażna 6
D	Hażna 3	Hażna 3	Hażna 3	Hażna 7	Hażna 7	Hażna 7

40. Wara 48 siegħa, il-platti ta' esponiment jitnehhew mill-inkubatur u kull toqba tiġi kkontrollata taht il-mikroskopju għall-kundizzjoni taċ-ċelloli (kemm qabdu, il-morfologija, il-grad ta' konfluwenza) u sinjali ta' ċitotossicità. Il-midjum minn kull toqba jinqasam f'żewġ ammonti ndaqs (madwar 490 µl kull wiehied) u jiġi ttrasferit f'żewġ kunjetti separati mmarkati kif xieraq (jiġifieri alikwota waħda biex jiġi pprovdut kampjun ta' riżerva għal kull toqba). Biex jiġi evitat milli jinxfu ċ-ċelloli, il-midjum jitneħħa ringiela, ringiela jew kolonna, kolonna u jiġi sostitwit ma' midjum għall-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossicità taċ-ċelloli. Jekk il-vijabbiltà/ċitotossicità taċ-ċelloli ma titkejjilx mill-ewwel, jiżdied 200 µl PBS b'Ca²⁺ u Mg²⁺ f'kull toqba. Il-midjums jiġu ffrizati f'– 80 °C sa ma jsir iktar ipproċessar biex jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-ormoni (ara l-paragrafi 44-46). Filwaqt li T u E2 f'midjum miżmum f'– 80 °C huma ġeneralment stabbli għal tal-inqas 3 xhur, l-istabbiltà tal-ormoni matul il-ħżin għandha tiġi dokumentata fi hdan kull laboratorju.
41. Eżatt wara li jitneħħa l-midjum, jiġu determinati l-vijabbiltà/ċitotossicità taċ-ċelloli għal kull platt ta' esponiment.

Determinazzjoni tal-Vijabbiltà taċ-Ċelloli

42. Assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossicità taċ-ċelloli tal-ghażla tista' tintuza biex jiġi determinat l-impatt potenzjali tas-sustanza kimika tat-test fuq il-vijabbiltà taċ-ċelloli. L-assaġġ għandu jkun jista' jipprovdi kejl veru tal-perċentwal ta' ċelloli vijabbli preżenti f'toqba, jew għandu jintwera li dan huwa direttament paragunabbli (funzjoni lineari ta') mal-Assaġġ Live/Dead® (ara l-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4)). Assaġġ alternattiv li ntwerja li jaħdem daqstantiehor huwa t-test MTT [3-(4,5-dimetiltetrazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolju bromur] (18). Il-valutazzjoni tal-vijabbiltà taċ-ċelloli bl-użu tal-metodi ta' hawn fuq hija kejl relattiv li mhux bilfors juri relazzjonijiet lineari man-numru assolut ta' ċelloli f'toqba. Għalhekk, l-analist għandu jagħmel valutazzjoni viżwali parallela sogġettiva ta' kull toqba, u għandhom jittiehdu ritratti diġitali tal-SCs u tal-ikbar żewġ konċentrazzjonijiet mhux tossiċi li mbagħad jiġu arkivjati biex tkun tista' ssir valutazzjoni iktar tard tad-densità vera taċ-ċelloli jekk ikun hemm bżonn. Jekk spezzjoni viżwali jew kif muri mill-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossicità jidher li hemm zieda fin-numru ta' ċelloli, iż-zieda apparenti trid tiġi verifikata. Jekk tiġi verifikata zieda fin-numri ta' ċelloli, din għandha tiġi ddikjarata fir-rapport tat-test. Il-vijabbiltà taċ-ċelloli ser tingħata b'mod relattiv għar-rispons medju fl-SCs, li jitqies li huwa ċelloli vijabbli 100 %, u hija kkalkolata kif xieraq għall-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossicità taċ-ċelloli li jintuza. Għall-assaġġ tal-MTT, tista' tintuza l-formula li ġejja:

▼ M5

% **ċelloli vijabbli** = (rispons fit-toqba – rispons medju f'toqob mogħtija MeOH [= 100 % mejtin]) ÷ (rispons medju f'toqob SC – rispons medju f'toqob mogħtija MeOH [= 100 % mejtin])

43. Toqob b'varjabbiltà inqas minn 80 %, relatati mal-vijabbiltà medja fl-SCs (= 100 % vijabbiltà), ma għandhomx ikunu inkluzi fl-analizi tad-dejta finali. L-inibizzjoni tal-isterojdoġenesi li ssehh fil-preżenza ta' kważi 20 % ċitotossicità għandha tiġi evalwata bir-reqqa biex jiġi żgurat li ċ-ċitotossicità mhijiex il-kawża għall-inibizzjoni.

Analizi tal-Ormoni

44. Kull laboratorju jista' juża sistema ta' kejl tal-ormoni tal-għażla tiegħu għall-analizi ta' T u E2. Jistgħu jintużaw alikwoti ta' riżerva ta' midjum minn kull grupp tal-kura biex jithejjew dilwizzjonijiet halli l-konċentrazzjoni tiġi fi hdan il-parti lineari tal-kurva standard. Kif osservat fil-paragrafu 29, kull laboratorju għandu juri l-konformità tas-sistema ta' kejl tal-ormoni tiegħu (eż., ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) mal-kriterji tal-QC billi janalizza midjum supplimentat miżjud b'kontroll tal-ormon intern qabel ma jwettaq testijiet tal-QC jew ittestjar ta' sustanzi kimiċi. Sabiex jiġi żgurat li l-komponenti tas-sistema tat-test ma jxekklu il-kejl tal-ormoni, l-ormoni jista' jkollhom bżonn jiġu estrattati mill-midjums qabel ma jitkejlu (ara l-paragrafu 30 għall-kundizzjonijiet li fihom ikun hemm jew ma jkunx hemm bżonn estrazzjoni). Huwa rakkomandat li ssir estrazzjoni wara l-proċeduri fl-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4).
45. Jekk qed tintuża kitt kummerċjali tat-testijiet biex titkejjel il-produzzjoni tal-ormoni, l-analizi tal-ormoni għandha ssir kif speċifikat fil-manwali pprovduti mill-manifattur tal-kitt tat-testijiet. Hafna mill-manifatturi għandhom proċedura unika li biha jsiru l-analizijiet tal-ormoni. Id-dilwizzjonijiet tal-kampjuni jridu jiġu aġġustati b'tali mod li l-konċentrazzjonijiet mistennija tal-ormoni għall-kontrolli tas-solvent jaqgħu fi hdan iċ-ċentru tal-medda lineari tal-kurva standard tal-assaġġ individwali (Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4)). Valuri li jaqgħu barra s-sehem lineari tal-kurva standard għandhom jiġu rrifjutati.
46. Il-konċentrazzjonijiet tal-ormoni finali huma kkalkolati kif ġej:

Eżempju:

Estratti:	450 µl midjum
Rikostitwiti f':	250 µl bafer tal-assaġġ
Dilwizzjoni fl-Assaġġ:	1:10 (biex il-kampjuni jiġi fi hdan il-medda lineari tal-kurva standard)
Konċentrazzjoni ta' Ormoni fl-Assaġġ:	150 pg/ml (diġà aġġustata għall-konċentrazzjoni għal kull ml tal-kampjun fl-assaġġ)
Irkupru:	89 %
Konċentrazzjoni tal-ormoni finali =	(Konċentrazzjoni tal-ormoni (għal kull ml) ÷ irkupru) (fattur ta' dilwizzjoni)
Konċentrazzjoni tal-ormoni finali =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼ M5

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

47. Għandhom isiru tal-inqas żewġ testijiet indipendenti tal-assaġġ. Sakemm informazzjoni preċedenti dwar il-limitu ta' solubilità jew iċ-ċitotossicità ma tipprovdix bażi għall-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test, huwa rakkomandat li l-konċentrazzjonijiet tat-test għall-ewwel test ikollhom intervalli ta' $\log_{10}$ b' 10^{-3} M li tkun il-konċentrazzjoni massima. Jekk is-sustanza kimika hija solubbli, u mhux ċitotossika fl-ebda mill-konċentrazzjonijiet ittestjati, u l-ewwel test ikun negattiv għall-konċentrazzjonijiet kollha, mela dan irid jiġi kkonfermat f'test wiehed jew iktar billi jintużaw l-istess kundizzjonijiet bħal dawk fl-ewwel test li sar (Tabella 7). Jekk ir-riżultati tal-ewwel test huma *ekwivoċi* (jiġifieri l-bidla ta' drabi hija statistikament sinifikanti mill-SC f'konċentrazzjoni waħda biss) jew pożittivi (jiġifieri l-bidla ta' drabi f'żewġ konċentrazzjonijiet magħn jew iktar hija statistika sinifikanti), it-test għandu jiġi ripetut kif indikat fit-Tabella 7 billi jiġu rfinati l-konċentrazzjonijiet tat-test magħżulin. Il-konċentrazzjonijiet tat-test fit-tieni u t-tielet test (jekk applikabbli) għandhom jiġu aġġustati fuq il-bażi tar-riżultati tal-konċentrazzjonijiet parentesi li ġew ittestjati inizjalment li kkaġunaw effett billi ntuża intervall ta' konċentrazzjoni ta' $1/2\text{-log}$ (eż., jekk it-test originali ta' 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM irriżulta f'induzzjonijiet b'1 u 10 μM , il-konċentrazzjonijiet ittestjati fit-tieni test għandhom ikunu 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), sakemm ma jkunx hemm b'żonn li jintużaw konċentrazzjonijiet inqas biex jinkiesb LOEC. Fl-aħhar każ, tal-inqas hames konċentrazzjonijiet taħt l-inqas konċentrazzjoni ttestjata fl-ewwel test għandhom jintużaw fit-tieni test billi tintuża skala ta' $1/2\text{-log}$. Jekk it-tieni test ma jikkonfermax l-ewwel test (jiġifieri l-importanza statistika ma ssehhx fil-konċentrazzjoni li qabel ittestjat pożittiva, inkrement tal-konċentrazzjoni ta' ± 1), għandu jsir it-tielet esperiment billi jintużaw il-kundizzjonijiet originali ta' ttestjar. Riżultati *ekwivoċi* fl-ewwel test jitqiesu negattivi jekk l-effett osservat ma jkunx jista' jiġi kkonfermat fl-ebda wiehed miż-żewġ testijiet ta' wara. Riżultati *ekwivoċi* jitqiesu risponsi (effett) pożittivi meta r-rispons ikun jista' jiġi kkonfermat f'tal-inqas testiehor fi hdan inkrement tal-konċentrazzjoni ta' ± 1 (ara t-taqsim 55 għall-Proċedura ta' Interpretazzjoni tad-Dejta).

Tabella 7

Matriċi tad-deċiżjonijiet għal xenarji ta' eżitu possibbli

Test 1	Test 2		Test 3		Deċiżjoni	
Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Pożittiva	Negattiva
Negattiv	Konferma ^(a)	Negattiv	Waqfa			X
Negattiv	Konferma ^(a)	Pożittiv	Irfinar ^(b)	Negattiv		X
Ekwivoku ^(c)	Irfinar ^(b)	Negattiv	Konferma ^(a)	Negattiv		X
Ekwivoku ^(c)	Irfinar ^(b)	Negattiv	Konferma ^(a)	Pożittiv	X	
Ekwivoku ^(c)	Irfinar ^(b)	Pożittiv			X	
Pożittiv	Irfinar ^(b)	Negattiv	Konferma ^(a)	Pożittiv	X	

▼ M5

Test 1	Test 2		Test 3		Deċiżjoni	
Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Deċiżjoni	Xenarju	Pożittiva	Negattiva
Negattiv	Konferma ^(a)	Pożittiv	Irfinar ^(b)	Pożittiv	X	
Pożittiv	Irfinar ^(b)	Pożittiv	Waqfa		X	

^(a) Ikkonferma test preċedenti bl-użu tal-istess tifsila tal-esperiment.

^(b) Erga' ttestja l-assaġġ b'intervall ta' konċentrazzjoni ta' 1/2-log (parentesi tal-konċentrazzjoni li ttestjat notevolment differenti fl-esperiment preċedenti).

^(c) Bidla ta' drabi f'konċentrazzjoni wahda hija b'mod sinifikatament differenti fil-livell statistiku mill-SC

Kontroll tal-Kwalità tal-Platt tat-Test

48. Minbarra l-ilhuq tal-kriterji għall-platt tal-QC, għandhom jiġu ssodisfati kriterji oħrajn tal-kwalità li jappartjenu għal varjazzjoni aċċettabbli bejn toqob replikati, esperimenti replikati, linearità u sensitività tas-sistemi ta' kejl tal-ormoni, varjabbiltà bejn kejljet replikati tal-ormini tal-istess kampjun, u rkupru tal-perċentwal ta' zidiet mal-ormoni wara estrazzjoni tal-midjum (jekk applikabbli; ara l-Paragrafu 30 rigward ir-reqwiziti ta' estrazzjoni) u dawn huma pprovduti fit-Tabella 8. Id-dejta għandha tkun taqa' fi hdan il-meded aċċettabbli definiti għal kull parametri li għandu jitqies għal evalwazzjoni ulterjuri. Jekk dawn il-kriterji ma jkunux issodisfati, l-ispreadsheet għandha tinnota li l-kriterji tal-QC ma ġewx issodisfati għall-kampjun inkwistjoni, u li l-kampjun għandu jerga' jerga' jiġi analizzat jew jitneħħa mis-sett tad-dejta.

Tabella 8

Meded u/jew varjazzjoni aċċettabbli (%) għall-parametri tal-platt tat-test tal-assaġġ ta' H295R

(LOQ: Limitu ta' Kwantifikazzjoni tas-sistema ta' mmanigġjar tal-ormoni. CV: Koeffiċjent tal-varjazzjoni; SC: Kontroll tas-Solvent; DPM: Diżintegrazzjonijiet fil-minuta)

	Tqabbil Bejn	T	E2
Produzzjoni tal-ormoni bazi f'SCs	Darbiet ikbar mil-LOQ	≥ 5 darbiet iktar	≥ 2,5 darbiet iktar
Esperimenti tal-Esponiment — Fi hdan is-CV tal-Platt għal SCs (Toqob Replikati)	Konċentrazzjonijiet Assoluti	≤ 30 %	≤ 30 %
Esperimenti tal-Esponiment — Bejn CV tal-Platt għal SCs (Esperimenti Replikati)	Bidla fi Drabi Ikbar	≤ 30 %	≤ 30 %
Sistema ta' Kejl tal-Ormoni — Sensittività	Tnaqqis fi drabi identifikabbli relatat mal-SC	≥ 5 darbiet inqas	≥ 2,5 darbiet inqas
Sistema ta' Kejl tal-Ormoni — CV tal-Kejl Replikati għal SCs ^(a)	Konċentrazzjonijiet Assoluti	≤ 25 %	≤ 25 %
Estrazzjoni tal-Midjum — Irkupru tal-Istandard Intern 3H (Jekk Applikabbli)	DPM	≥ 65 % Nominali	

^(a) B'referenza għall-kejljet replikati tal-istess kampjun

▼ M5

ANALIŻI U RAPPORTAR TAD-DEJTA

Analizi tad-Dejta

49. Biex jiġu evalwati ż-żieda/it-tnaqqis relatati fi produzzjoni tal-ormoni kumikament alterata, ir-riżultati għandhom jiġu normalizzati għall-valur medju tal-SC ta' kull platt tat-test, u r-riżultati espressi bħala bidliet relatati mal-SC f'kull platt tat-test. Id-dejta kollha għandha tiġi espressa bħala devjazzjoni standard (SD) medja ta' ± 1 .
50. Dejta dwar l-ormoni mit-toqob fejn iċ-ċitotossicità kienet inqas minn 20 % biss għandha tkun inkluża fl-analiżi tad-dejta. Il-bidliet relatati għandhom jiġu kkalkolati kif ġej:

Bidla Relattiva = (Konċentrazzjoni ta' ormoni f'kull toqba) ÷ (Konċentrazzjoni medja tal-ormoni fit-toqob kollha ta' kontroll tas-solvent).

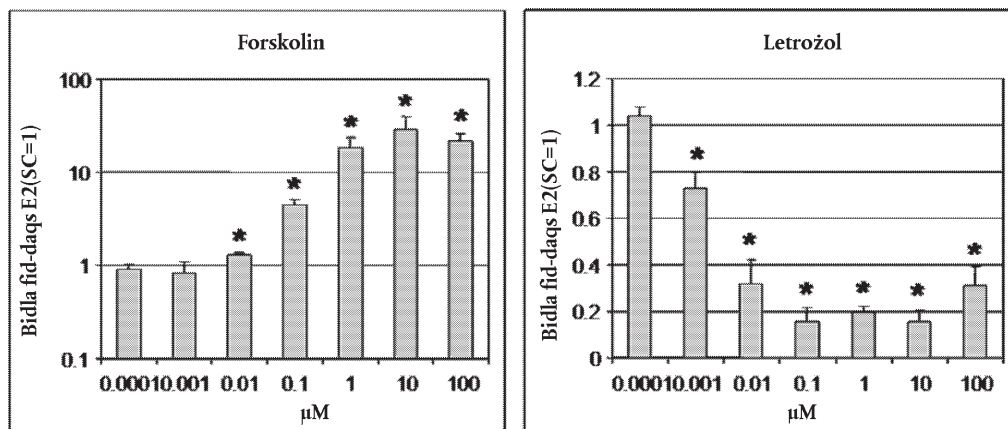
51. Jekk permezz ta' spezzjoni viżwali tat-toqba jew kif muri mill-assaġġ tal-vijabbiltà/ċitotossicità deskritti fil-paragrafu 42 jidher li hemm żieda fin-numru ta' ċelloli, iż-żieda apparenti trid tiġi verifikata. Jekk tiġi verifikata żieda fin-numri ta' ċelloli, din għandha tiġi ddikjarata fir-rapport tat-test.
52. Qabel ma jsiru analiżijiet statistiċi, għandhom jiġu evalwati s-suppożizzjonijiet tan-normalità u l-omoġenità tal-varjanza. In-normalità għandha tiġi evalwata billi jintużaw plots standard tal-probabilità jew metodu statistiku xieraq ieħor (eż., test ta' Shapiro-Wilk). Jekk normalment ma ssirx distribuzzjoni tad-dejta (bidliet fi drabi), għandu jsir tentattiv ta' trasformazzjoni tad-dejta biex tkun approssimata distribuzzjoni normali. Jekk normalment issir distribuzzjoni jew tiġi approssimata distribuzzjoni normali tad-dejta, id-differenzi bejn il-gruppi ta' konċentrazzjoni tas-sustanza kimika u l-SCs għandhom jiġu analizzati billi jintuża test parametrik (eż., it-Test ta' Dunnett) bil-konċentrazzjoni li hija l-varjabbli indipendenti, u r-rispons (bidla fi drabi) il-varjabbli dipendenti. Jekk normalment id-dejta ma tiġix distribwita, għandu jintuża test xieraq mhux parametrik (eż., it-test ta' Kruskal Wallis, it-test Steel's Many-one rank). Id-differenzi jitqiesu sinifikanti f'p ≤ 0.05 . L-evalwazzjonijiet statistiċi jsiru fuq il-bażi tal-valuri medji għal kull toqba li jirrappreżentaw punti ta' dejta replikati indipendenti. Huwa antiċipat li minhabba l-intervall kbir tad-dożi fl-ewwel test (skala $\log_{10}$) f'hafna kazijiet mhuwiex ser ikun possibbli li jiġu deskritti relazzjonijiet ċari bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons fejn l-ikbar żewġ dożi ser ikunu fis-sehem lineari tal-kurva sigmojde. Għaldaqstant, għall-ewwel test jew kwalunkwe sett ta' dejta ieħor fejn issehh din il-kundizzjoni (eż., fejn ma tkun tista' tiġi stmata ebda effikaċja massima), ser jiġu applikati statistiki varjabbli fissi tat-tip I kif deskritti iktar 'il fuq.
53. Jekk ikun hemm iktar minn żewġ punti ta' dejta fis-sehem lineari tal-kurva u meta jkun jistgħu jiġu kkalkolati l-effikaċji massimi — kif inhu antiċipat għal uħud mit-tieni testijiet li jsiru billi jintuża intervall semi-log ta' konċentrazzjonijiet ta' esponiment — għandu jintuża mudell ta' rigressjoni probit, logit jew ieħor xieraq biex jiġu kkalkolati l-konċentrazzjonijiet effettivi (eż., EC50 u EC20).
54. Għandhom jiġu pprovduti riżultati kemm f'format grafiku (grafts bil-kolonna li jirrappreżentaw l-SD medja ± 1) u f'tabella (LOEC/NOEC, direzzjoni tal-effett, u l-qawwa tar-rispons massimu li hija parti mis-sehem dożar-rispons tad-dejta) (ara l-Figura 3 għal eżempju). Valutazzjoni tad-dejta titqies valida biss jekk tkun giet ibbażata fuq tal-inqas żewġ testijiet li jkun saru b'mod indipendenti. Esperiment jew test jitqies importanti jekk ikun sar f'data differenti billi jintuża sett għid ta' soluzzjonijiet u kontrolli. Il-medda ta' konċentrazzjoni użata fit-testijiet 2 u 3 (jekk ikun hemm bżonnhom) tista' titfassal fuq il-bażi tar-riżultati tat-test 1 biex tiġi definita ahjar il-medda doża-rispons li fiha l-LOEC (ara l-paragrafu 47).

▼ **M5**

Figura 3

Eżempju tal-preżentazzjoni u l-evalwazzjoni tad-dejta miksuba matul it-tweġġ ta' H295R f'format grafiku u tabulari.

(L-asteriski jindikaw differenzi statistikament sinifikanti mill-kontroll tas-solvent ($p < 0,05$). (LOEC: L-inqas konċentrazzjoni effettiva osservata; Bidla Mass: Sahħa massima tar-rispons osservat fi kwalunkwe konċentrazzjoni relatata mar-rispons medju tal-SC (= 1))



Sustanza Kimika	LOEC	Bidla Mass
Forskolin	0,01	0,15-il darba
Letrozol	0,001	29 darba

Proċedura ta' Interpretazzjoni tad-Dejta

55. Sustanza kimika tat-test tiġi ġġudikata pożittiva jekk l-induzzjoni bi drabi tkun statistikament differenti ($p \leq 0,05$) mill-kontroll tas-solvent f'zewġ konċentrazzjonijiet maġenb xulxin f'tal-inqas żewġ testijiet indipendenti (Tabella 7). Sustanza kimika tat-test tiġi ġġudikata negattiva wara żewġ testijiet negattivi indipendenti, jew fi tliet testijiet, li jinvolvu żewġ testijiet negattivi u test ekwivoku jew pożittiv. Jekk id-dejta ġġenerata fi tliet esperimenti indipendenti ma tissodisfax il-kriterji ta' deċiżjoni elenkati fit-Tabella 7, ir-riżultati tal-esperiment ma jkunux interpretabbli. Ir-riżultati f'konċentrazzjonijiet li jaqḡu l-limitu tas-solubilità jew f'konċentrazzjonijiet ċitotossiċi ma għandhomx ikunu inklużi fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

Rapport tat-Test

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

Facilità ta' ttestjar

— Isem il-facilità u l-post,

— Id-direttur tal-istudju u persunal ieħor u r-responsabilitajiet ta' studju tiegħu,

— Id-dati li fihom beda u ntemm l-istudju.

▼ **M5***Sustanza kimika tat-test, reagenti u kontrolli*

- L-identità (isem/Nru tas-CAS kif xieraq), is-sors, in-numru tal-lott, il-purità, il-fornitur, u l-karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, ir-reagenti u l-kontrolli,
- L-ghamla fizika u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti tas-sustanza kimika tat-test,
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-metodu tal-frekwenza tat-thejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test, ir-reagenti u l-kontrolli,
- L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test.

Ċelloli

- Is-sors u t-tip ta' ċelloli,
- In-numru ta' mogħdijiet taċ-ċelloli (identifikatur tal-mogħdijiet taċ-ċelloli) taċ-ċelloli użati fit-test,
- Deskrizzjoni tal-proċeduri għall-manutenzjoni tal-kolturi taċ-ċelloli.

Rekwiżiti ta' qabel l-ittestjar (jekk applikabbli)

- Deskrizzjoni u riżultati tat-test ta' interferenza tal-assaġġ tal-ormoni mas-sustanza kimiċi,
- Deskrizzjoni u riżultati tal-kejliet tal-effiċjenza tal-estrazzjoni tal-ormoni,
- Il-kurvi standard u ta' kalibrazzjoni għall-assaġġi analitiċi li għandhom ikunu inklużi,
- Il-limiti ta' identifikazzjoni għall-assaġġi analitiċi magħżulin,

Kundizzjonijiet tat-test

- Il-kompożizzjoni tal-midjums,
- Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test,
- Id-densità taċ-ċelloli (konċentrazzjonijiet stmati jew imkejlin taċ-ċelloli wara 24 u 48 siegħa),
- Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test (limitu tas-solubilità, jekk determinat),
- Il-ħin u l-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni.

Riżultati tat-test

- Dejta mhux ipproċessata għal kull toqba għal kontrolli u sustanzi kimiċi tat-test—kull kejl replikat fil-forma ta' dejta originali pprovduta mill-istrument użat biex titkejjel il-produttjoni tal-ormoni (eż., OD, unitajiet tal-fluorexxenza, DPM, eċċ.),
- Il-validazzjoni tan-normalità jew l-ispjegazzjoni tat-trasformazzjoni tad-dejta;
- Ir-risponsi medji $\pm$ 1 SD għal kull toqba mkejla,
- Dejta dwar iċ-ċitotossicità (konċentrazzjonijiet tat-test li kkaġunaw ċitotossicità),
- Konferma li ġew issodisfati r-rekwiżiti tal-QC,

▼M5

- Il-bidla relattiva mqabla mal-kontroll tas-solventi kkoreġut għaċ-ċitotosiċità,
- Graff bil-kolonna li juri relattiv (bidla ta' drabi) f'kul konċentrazzjoni, SD u sinifikanza statistika kif spjegat fil-paragrafu 49-54.

Interpretazzjoni tad-dejta

- Applikazzjoni tal-proċedura ta' interpretazzjoni tad-dejta għar-riżultati u diskussjoni tas-sejbiet,

Diskussjoni

- Hemm xi indikazzjoni mill-istudju dwar il-possibilità li d-dejta dwar T/E2 tista' tkun influwenzata minn effetti indiretti fuq il-mogħdijiet glukokortikoidi u mineralokortikoidi?

*Konkluzjonijiet***TAGHRIF**

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, fl-Appendiċi 2 għall-Kapitolu B.54 ta' dan l-Anness.
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- (4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Pariġi. Disponibbli fuq [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Pariġi. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Disponibbli fuq: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmv/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- (7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- (8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- (9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.

▼ **M5**

- (10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- (11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- (12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- (13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- (14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- (15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731-737.
- (16) Il-Kapitolu B.55 ta' dan l-Anness: Bijoassagg' Hersherberger f'Firien: Assagg' ta' Tgharbil ta' Terminu Qasir ghal Proprjetajiet (Anti)Androgenici.
- (17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- (18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55-63.
- (19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- (20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.

▼ **M5***Appendiċi*

DEFINIZZJONIJIET:

Konfluwenza tirreferi għall-kopertura jew il-proliferazzjoni li ċ-ċelloli jithallew jagħmlu tul jew fi hdan il-midjum tal-koltura.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

CV tirreferi għall-koeffiċjent tal-varjazzjoni, u hija definita bħala l-proporzjon tad-devjazzjoni standard ta' distribuzzjoni għall-medja aritmetiku tagħha.

CYP tirreferi għall-monoossigenasi taċ-ċitokroma P450, familja ta' geni u l-enżimi prodotti minnhom li huma involuti fl-iskattar ta' firxa wiesgħa ta' reazzjonijiet bijokimiċi inklużi s-sintezi u l-metaboliżmu tal-ormoni sterojdi.

DPM hija dizintegrazzjoni fil-minuta. Hija n-numru ta' atomi fi kwantità partikolari ta' materjal radjuattiv li huwa identifikat li ntilef f'minuta.

E2 hija 17 β -estradiol, l-iktar estrogen importanti fis-sistemi tal-mammiferi.

Ċelloli H295R huma ċelloli adenokarcinoma tal-bniedem li għandhom il-karatteristiċi fiżjoloġiċi ta' ċelloli adenali tal-fetu tal-bniedem mhux differenzjati b'mod żonali u li jresprimu l-enżimi kollha tal-mogħdija tal-isterojdoġenesi. Huma disponibbli mill-ATCC.

Midjum tal-iffriżar jintuża biex jiġu ffrizati u jinħażnu ċelloli ffrizati. Jikkonsisti f'midjum tal-hzin flimkien ma' BD NuSerum u dimetil sulfossidu.

Medda Lineari hija l-medda fi hdan il-kurva standard għal sistema ta' kejl tal-ormoni li fiha r-riżultati jkunu proporzjonati għall-koncentrazzjoni tal-analit preżenti fil-kampjun.

LOQ tfisser "*Limitu ta' Kwantifikazzjoni*", u hija l-inqas kwantità ta' sustanza kimika li tista' tiġi distinta min-nuqqas ta' dik is-sustanza kimika (valur vojta) fi hdan limitu ta' kunfidenza ddikjarat. Għall-fini ta' dan il-metodu, l-LOQ tipikament hija definita mill-manifattur tas-sistemi tat-test jekk ma jkunx speċifikat b'mod differenti.

LOEC l-Inqas Koncentrazzjoni b'Effett Osservata, l-inqas livell ta' koncentrazzjoni li fih ir-rispons tal-assaġġ ikun statistikament differenti minn dak tal-kontroll tas-solvent.

NOEC hija l-Koncentrazzjoni bl-Ebda Effett Osservat, li hija l-ogħla koncentrazzjoni ttestjata jekk l-assaġġ ma jipprovdix rispons pożittiv.

Mogħdija hija n-numru ta' drabi li ċ-ċelloli jinqasmu wara t-tnedija ta' koltura minn hażna. Il-mogħdija inizjali li nbdiet mill-hażna ffrizata hija assenjata n-numru wiehied (1). Iċ-ċelloli li nqasmu darba jiġu mmarkati mogħdija 2, eċċ.

PBS hija s-salmastru bafer fosfat ta' Dulbecco.

Kontroll tal-Kwalità, imqassra QC, tirreferi għall-kejl meħtieġa biex tiġi żgurata dejta valida.

Platt ta' kontroll tal-kwalità huwa platt b'24 toqba li fih żewġ koncentrazzjonijiet tal-kontrolli pożittivi u negattivi biex tiġi ssorveljata l-prestazzjoni ta' lott ġdid ta' ċelloli jew biex jiġu pprovduti l-kontrolli pożittivi għall-assaġġ meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi.

Test huwa esperiment indipendenti kkaratterizzat minn sett ġdid ta' soluzzjonijiet u kontrolli.

▼ **M5**

Midjum tal-ħżin huwa l-bażi għall-preparazzjoni ta' reagenti oħrajn. Jikkonsisti f'tahlita 1:1 ta' Dulbecco's Modified Eagle's Medium u t-tahlita tan-Nutrijenti F-12 ta' Ham (DMEM/F12) f'bafer ta' 15 mM HEPES bla fenol aħmar jew bikarbonat tas-sodju. Il-bikarbonat tas-sodju jiżdied bhala l-bafer, ara l-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4).

Midjum supplimentat jikkonsisti f'midjum tal-ħżin flimkien ma' BD Nu-Serum u tahlita primjum ITS+, ara l-Appendiċi II tar-rapport ta' validazzjoni (4).

Sterojdoġenesi hija l-mogħdija sintetika li twassal mill-kolesterol għad-diversi ormoni steroidi. Bosta intermedjati fil-mogħdija tas-sinteżi tal-isteroidi bħal progesteron u testosteron huma ormoni importanti meta waħedhom iżda jservu wkoll ta' prekursori għal ormoni lil hinn fil-mogħdija sintetika.

T tfisser testosteron, wieħed mill-iktar żewġ androgeni importanti fis-sistemi mammiferi.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata billi ntuża dan il-metodu ta' ttestjar.

Platt tat-test huwa l-platt li fih iċ-ċelloli H295R jiġu esposti għal sustanzi kimiċi tat-test. Il-platti tat-test fihom il-kontroll tas-solvent u s-sustanza kimika tat-test f'seba' livelli ta' konċentrazzjoni fi triplikati.

Tripsina 1X hija soluzzjoni dilwita tat-tripsina tal-enzima, proteasi tas-serina pankreatika, użata biex tillaxxa iċ-ċelloli minn platt ta' kultivazzjoni taċ-ċelloli, ara l-Appendiċi III tar-rapport ta' validazzjoni (4).

▼ M5

B.58. ASSAĠĠI TAL-MUTAZZJONI TAL-ĠENI SOMATIĠI U TAČ-CELLOLI TAL-ĠERMI TA' RODITURI TRANSĠENIĠI**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tal-OECD dwar it-Testijiet (TG) Nru 488 (2013). Il-metodi ta' ttestjar tal-UE huma disponibbli għal firxa wiesgħa ta' assaġġi tal-mutazzjoni *in vitro* li kapaci jidentifikaw mutazzjonijiet fil-kromożomi u/jew fil-ġeni. Hemm metodi ta' ttestjar għal punti ahħarin *in vivo* (jiġifieri aberrazzjonijiet tal-kromożomi u sinteżi mhux skedata tad-DNA); madankollu, dawn ma jkejlux il-mutazzjonijiet tal-ġeni. Assaġġi tal-mutazzjoni ta' Rodituri Transġeniċi (TGR) jissodisfaw il-bżonn ta' testijiet *in vivo* prattiċi u disponibbli b'mod komuni għal mutazzjonijiet ta' ġeni.
2. L-assaġġi tal-mutazzjoni ta' TGR ġew analizzati b'mod estensiv (24)(33). Jużaw firien u ġrieden transġeniċi li fihom bosta kopji ta' vetturi plażmidi integrati b'mod kromozomali jew phage shuttle. It-transġeni fihom ġeni rapportaturi għall-identifikazzjoni ta' bosta tipi ta' mutazzjonijiet ikkaġunati *in vivo* mis-sustanzi kimiċi tat-test.
3. Mutazzjonijiet li jfegġu f'roditur jingħataw punteġġ billi jiġi rkuprat it-transġene u jiġi analizzat il-fenotip tal-ġene rapportatur f'oospitant batterjali deficijenti għall-ġene rapportatur. L-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR ikejlu mutazzjonijiet ikkaġunati f'ġeni ġenetikament newtrali rkuprati minn prattikament kwalunkwe tessut tar-roditur. Għalhekk, dawn l-assaġġi jgħelbu haġna mil-limitazzjonijiet eżistenti assoċjati mal-istudju ta' mutazzjoni tal-ġeni *in vivo* f'ġeni endoġeni (eż. tessuti limitati xierqa għal analiżi, għażla negattiva/pozittiva kontra mutazzjonijiet).
4. Il-piż tal-evidenza jissuggerixxi li t-transġeni jwieġbu għall-mutaġeni b'mod simili għal ġeni endoġeni, speċjalment fir-rigward tal-identifikazzjoni ta' sostituzzjonijiet ta' pari bażi, mutazzjonijiet fil-bidla tal-qafas, u thassiriet u tidhiliet żgħar(24).
5. Il-Workshops Internazzjonali dwar l-Ittestjar tal-Ġenotossicità (IWGT) approvaw l-inkluzjoni tal-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR għall-identifikazzjoni *in vivo* ta' mutazzjonijiet fil-ġeni, u rrakkomandaw protokoll għall-implimentazzjoni tagħhom (15)(29). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq dawn ir-rakkomandazzjonijiet. Analizi ulterjuri li ssostni l-użu ta' dan il-protokoll tista' tinkiseb f'(16).
6. Huwa anċipat li fil-ġejjieni jista' jkun possibbli li assaġġ tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR jingħaqad ma' studju tat-tossicità tad-doża ripetuta (Kapitolu B.7 ta' dan l-Anness). Madankollu, hemm bżonn ta' dejta biex jiġi żgurat li s-sensittività tal-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR mhijiex affettwata mill-perjodu iqsar ta' żmien ta' jum bejn tmien il-perjodu ta' għoti u l-hin tal-kampjunar, kif użat fl-istudju tat-tossikologija b'doża ripetuta, imqabbel mat-3 ijiem użati fl-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR. Hemm bżonn dejta wkoll biex tindika li l-prestazzjoni tal-assaġġ b'doża ripetuta mhijiex affettwata b'mod avvers billi ntużat razza ta' rodituri transġeniċi minflok razez ta' rodituri tradizzjonali. Meta din id-dejta tkun disponibbli, dan il-metodu ta' ttestjar ser jiġi aġġornat.
7. Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi.

▼ M5

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

8. L-assaġġi tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR li għalihom hemm disponibbli biżżejjed dejta biex issostni l-użu tagħhom f'dan il-metodu ta' ttestjar huma: ġurdien batterjofago *lacZ* (MutaTMMouse); ġurdien plażmidu *lacZ*; ġurdien u far *gpt* delta (*gpt* u *Spi*⁻); ġurdien u far *lacI* (Big Blue®), kif isiru f'kundizzjonijiet standard. Barra minn hekk, l-assaġġ ta' għazla pożittiva *cII* jista' jintuża għall-evalwazzjoni ta' mutazzjonijiet fil-mudelli Big Blue® u MutaTMMouse. Normalment, il-mutaġenesi fil-mudelli ta' TGR tiġi vvalutata bħala frekwenza tal-mutanti; madankollu, jekk ikun hemm bżonn, analiżi molekulari tal-mutazzjonijiet tista' tipprovdi iktar informazzjoni (ara l-paragrafu 24).
9. Dawn it-testijiet ta' mutazzjoni tal-ġeni *in vivo* fuq roditori huma speċjalment rilevanti għall-valutazzjoni tal-periklu mutaġeniku peress li r-risponsi tal-assaġġi huma dipendenti fuq metabolizmu *in vivo*, farmakokinetika, proċessi ta' tiswija tad-DNA, u sintezi tat-translezzjoni tad-DNA, għad li dawn jistgħu jvarjaw bejn l-ispeċi, bejn it-tessuti u bejn it-tipi ta' hsara fid-DNA. Assaġġ *in vivo* għal mutazzjonijiet tal-ġeni huwa utli għal investigazzjoni ulterjuri ta' effett mutaġeniku identifikat minn sistema *in vitro*, u bħala segwitu għar-risultati tat-testijiet billi jintużaw punti aħharin *in vivo* oħrajn (24). Minbarra li hija assoċjata b'mod kawżali mal-induzzjoni tal-kanċer, il-mutazzjoni tal-ġeni hija punt aħhari rilevanti għat-tbassir ta' mard mhux kanċeruż ibbażat fuq mutazzjoni f'tessuti somatiċi (12)(13) kif ukoll mard trasmess permezz tal-linja ġerminali.
10. Jekk hemm evidenza li s-sustanza kimika tat-test, jew metabolita rilevanti, ma hi ser tilhaq ebda tessut ta' interess, ma jkunx xieraq li jsir assaġġ tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Fl-assaġġi deskritti fil-paragrafu 8, il-ġene fil-mira huwa ta' origini batterjali jew batterjofaga, u l-mezz ta' rkupru mid-DNA ġenomika tar-roditori huwa permezz ta' inkorporazzjoni tat-transġene f'vettur batterjofagu λ jew vettur shuttle plażmid. Il-proċedura tinvolvi l-estrazzjoni tad-DNA ġenomiku mit-tessut ta' interess tar-roditori, l-ipproċessar *in vitro* tad-DNA ġenomiku (jiġifieri l-imballaġġ ta' vetturi λ , jew il-ligazzjoni u l-elettroporazzjoni ta' plażmidi għall-irkupru tal-vettur shuttle), u l-identifikazzjoni sussegwenti ta' mutazzjonijiet f'ospitanti batterjali f'kundizzjonijiet xierqa. L-assaġġi jhaddmu transġeni newtrali li malajr jistgħu jiġu rkuprati minn hafna mit-tessuti.
12. L-esperiment bażiku tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' TGR jinvolvi kura tar-roditur b'sustanza kimika fuq perjodu ta' żmien. Is-sustanzi kimiċi jistgħu jingħataw permezz ta' kwalunkwe rotta xierqa, inkluża impjantazzjoni (eż. ittestjar ta' apparat mediku). Il-perjodu totali li matulu annimali jingħata d-doża jissegħa il-perjodu tal-ghoti. L-ghoti normalment ikun segwit minn perjodu ta' żmien, qabel is-sagrifiċċju, li matulu s-sustanza kimika ma tingħatax u li matulu l-leżjonijiet tad-DNA mhux imsewwijin jiġu fissati f'mutazzjonijiet stabbli. Fit-tagħrif, dan il-perjodu ssejjaħ b'modi oħrajn bħala l-hin ta' manifestazzjoni, il-hin ta' fissazzjoni jew il-hin ta' espressjoni; tmiem dan il-perjodu huwa hin il-kampjunar (15)(29). Wara li l-annimal jiġi sagrifikat, id-DNA ġenomiku jiġi iżolat mit-tessut(i) ta' interess u jiġi purifikat.

▼ M5

13. Id-dejta għal tessut wiehed għal kull animal minn imballaġġi/ligazzjonijiet diversi normalment tiġi aggregata, u l-frekwenza tal-mutanti ġeneralment tiġi evalwata billi jintużaw total ta' bejn 10^5 u 10^7 unità li jiffurmaw plakka jew kolonja. Meta jintużaw metodi tal-ghazla pożittiva, l-unitajiet totali li jiffurmaw plakka jiġu determinat b'sett separat ta' platti mhux selettivi.
14. Il-metodi tal-ghazla pożittiva ġew żviluppati biex tithaffef l-identifikazzjoni tal-mutazzjonijiet kemm fil-ġene *gpt* [ġurdien u far *gpt* delta, fenotip *gpt*⁻ (20)(22)(28)] kif ukoll il-ġene *lacZ* [MutaTMMouse jew ġurdien plażmidu *lacZ* (3)(10)(11)(30)]; filwaqt li l-mutazzjonijiet tal-ġeni *lacI* f'animali Big Blue® jiġu identifikati permezz ta' metodu mhux selettiv li jidentifika mutanti permezz tal-generazzjoni ta' plakek ikkuluriti (kohol). Il-metodoloġija tal-ghazla pożittiva hija fis-sehh ukoll sabiex tidentifika mutazzjonijiet tal-punt li jfegġu fil-ġene *cII* tal-vettur shuttle batterjofago λ [ġurdien jew far Big Blue®, u MutaTMMouse (17)] u mutazzjonijiet imħassrin fil-ġeni λ *red* u *gam* [ghazla ta' Spi⁻ fil-ġurdien u l-far *gpt* delta (21)(22)(28)]. Il-frekwenza tal-mutanti tiġi kkalkolata billi jinqasam in-numru ta' plakek/-plażmidi li fihom mutazzjonijiet fit-transġene bin-numru totali ta' plakek/-plażmidi rkuprati mill-istess kampjun ta' DNA. Fl-istudji ta' mutazzjoni tal-ġeni tad-DNA, il-frekwenza tal-mutanti hija l-parametru rrapportat. Barra minn hekk, frekwenza tal-mutazzjoni tista' tiġi ddeterminata bħala l-frazzjon taċ-ċelloli li jgħorru mutazzjonijiet indipendenti; dan il-kalkolu jehtieg korrezzjoni għal espansjoni klonika permezz ta' sekwenzjar tal-mutanti rkuprati(24).
15. Il-mutazzjonijiet punteġġati fl-assaġġi tal-mutazzjoni tal-punt *lacI*, *lacZ*, *cII* u *gpt* jikkonsistu primarjament f'mutazzjonijiet tas-sostituzzjoni tal-pari bażi, mutazzjonijiet ta' bidla fil-qafas u tidhiliet/thassiriet żgħar. Is-sehem relattiv ta' dawn it-tipi ta' mutazzjoni fost mutazzjonijiet spontanji huwa simili għal dak li deher fil-ġene endoġenu *Hprt*. Thassiriet kbar jinqabdu biss bl-ghazla Spi⁻ u l-assaġġi plażmidi *lacZ* (24). Il-mutazzjonijiet ta' interess huma mutazzjonijiet *in vivo* li jfegġu fil-ġurdien jew fil-far. Mutazzjonijiet *in vivo* u *ex vivo*, li jistgħu jfegġu matul l-irkupru, ir-replikazzjoni jew it-tiswija tal-fago/plažmidi huma relattivament rari, u f'xi sistemi jistgħu jkunu identifikati b'mod speċifiku, jew esklużi mis-sistema tal-ghazla pożittiva/tal-ospitant batterjali.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Preparazzjonijiet

Għazla tal-ispeċi ta' animali

16. Bħalissa hemm disponibbli firxa ta' mudelli ta' identifikazzjoni tal-mutazzjoni tal-ġeni ta' ġrieden transġeniċi, u dawn is-sistemi ntużaw b'mod iktar mifruż minn mudelli ta' firien transġeniċi. Jekk jidher ċar li l-far huwa mudell iktar xieraq mill-ġurdien (eż. meta ssir investigazzjoni tal-mekkaniżmu ta' karċinoġenesi għal tumor li jidher biss f'firien, biex issir korrelazzjoni ma' studju dwar it-tossicità fil-firien, jew jekk ikun magħruf li l-metaboliżmu tal-far huwa jirrappreżenta ahjar il-metaboliżmu tal-bniedem), għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' mudelli tal-far transġeniku.

Kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija u tal-ġhalf

17. Idealment, it-temperatura fil-kamra tal-annimali tal-esperimenti għandha tkun ta' 22 °C (± 3 °C). Għad li l-umdità relattiva għandha tkun tal-inqas 30 % u idealment ma taqbiżx is-70 % hlief matul it-tindif tal-kamra, l-ghan għandu jkun li tinzamm umdità relattiva ta' 50-60 %. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, u b'sekwenza ta' kuljum ta' 12-il siegħa dawl, segwiti minn 12-il siegħa dlam. Għall-ġhalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-laboratorju bi provvista illimitata ta' ilma tajjeb għax-xorb. L-ghazla tad-dieta tista' tkun

▼ M5

influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata tahlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tinghata minn din ir-rotta. L-annimali għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (mhux iktar minn hamsa) tal-istess sess jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva. L-annimali jistgħu jitrabbew waħedhom jekk dan ikun xjentifikament iġġustifikat.

Preparazzjoni tal-annimali

18. Annimali żgħażaġh b'saħħithom li laħqu l-maturità sesswali (għalqu 8-12-il ġimgħa fil-bidu tal-kura) jiġu assenjati b'mod aleatorju fil-gruppi ta' kontroll u tal-kura. L-annimali jiġu identifikati b'mod uniku. L-annimali jiġu akklimatizzati għall-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas hamest ijiem. Il-ġaġeġ għandhom jiġu rranġati b'tali mod li l-effetti possibbli dovuti għat-tqegħid tal-ġaġġa jiġu minimizzati. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-annimali għandha tkun minima u ma taqbiżx $\pm 20\%$ tal-piż medju ta' kull sess.

Preparazzjoni tad-dożi

19. Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinhallu jew jiġu sospizi f'solventi jew veikoli xierqa jew jithalltu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponimenti bit-tehid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bħala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjetajiet fiżjokimiċi tagħhom. Għandhom jintużaw preparazzjonijiet friski tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabbiltà maturix l-aċċettabbiltà tal-ħżin.

Kundizzjonijiet tat-test*Solvent/veikolu*

20. Is-solvent/il-veikolu ma għandhomx jipproduċu effetti tossiċi fil-volumi tad-doża użati, u ma għandhomx ikunu ssuspettati b'reazzjoni kimika mas-sustanza kimika tat-test. Jekk jintużaw solventi/veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inkluzjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwem.

Kontrolli Pożittivi

21. Normalment għandhom jintużaw annimali konkurrenti bil-kontroll pożittiv. Madankollu, għal laboratorji li wrew kompetenza (ara l-paragrafu 23) u li użaw dawn l-assaġġi spiss, DNA minn annimali preċedenti kkurati bil-kontroll pożittiv jista' jkun inkluz ma' kull studju bħala konferma tas-suċċess tal-metodu. It-tali DNA mill-esperimenti fl-imġhoddi għandu jinkiseb mill-istess speċi u tessuti ta' interess, u jinħażen kif xieraq (ara l-paragrafu 36). Meta jintużaw kontrolli pożittivi konkurrenti, m'hemmx bżonn li jingħataw mill-istess rotta bhas-sustanza kimika tat-test; madankollu, il-kontrolli pożittivi għandhom ikunu magħrufin li jinduċu mutazzjonijiet f'tessut wiehed jew iktar ta' interess għas-sustanza kimika tat-test. Id-dożi tas-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom jingħażlu sabiex jipproduċu effetti dgħajfin jew moderati li b'mod kritiku jivvalutaw il-pres-tazzjoni u s-sensittività tal-assaġġ. Fit-Tabella 1 hemm inkluzi eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u uhud mit-tessuti fil-mira tagħhom.

▼ **M5**

Tabella 1

Eżempji ta' sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv u uħud mit-tessuti fil-mira tagħhom

Sustanza kimika tal-kontroll pożittiv u Nru tas-CAS	Isem EINECS u Nru tal- EINECS	Karatteristiċi	Tessut fil-Mira tal-Mutazzjoni	
			Far	Ġurdien
N-Ethyl-N-nitrosoarea [Nru tas-CAS 759-73-9]	N-Ethyl-N-nitro- sourea [212-072-2]	Mutaġen li jaġixxi dirett	Fwied, pulmin	Mudullun tal-ghadam, kolon, epitellju kolo- niku, intestin, fwied, pulmun, milsa, kilwa, ċelloli granulosi tal- ovarji, ċelloli germinali tal-irġiel
Etil carbamate (uretan) [CAS no. 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutaġen, jehtieg metabolizmu izda jipproduċi biss effetti dgħajfin		Mudullun tal-ghadam, prestonku, intestin zghir, fwied, pulmun, milsa
2,4-Djainotoluen [Nru tas-CAS 95-80-7]	4-Metil-m-fenilened- jamin [202-453-1]	Mutaġen, jehtieg metabolizmu, pożittiv ukoll fl- assagġ Spi ⁺	Fwied	Fwied
Benzo[a]piren [Nru tas-CAS 50-32-8]	Benzo[def]krisen [200-028-5]	Mutaġen, jehtieg metabolizmu	Fwied, omenta,	Mudullun tal-ghadam, sider, kolon, prestonku, stonku glandolari, qalb, fwied, pulmun, ċelloli germinali tal- irġiel

Kontrolli negattivi

22. Il-kontrolli negattivi, ikkurati b'solvent jew veikolu waħdu, u nkella kkurati bl-istess mod b'ħall-gruppi tal-kura, għandhom ikunu inkluzi għal kull hin tal-kampjunar. Fin-nuqqas ta' dejta tal-kontroll storika jew ippubblikata li turi li ma kien indott ebda effett ta' tħassir jew mutageniku mis-solvent/veikolu magħżul, il-kontrolli mhux ikkurati għandhom ikunu inkluzi wkoll għal kull hin tal-kampjunar sabiex tiġi stabbilita aċċettabbiltà tal-kontroll tal-veikolu.

Verifika tal-profiċjenza tal-laboratorju

23. Il-kompetenza f'dawn l-assaġġi għandha tiġi stabbilita billi tintwera l-hila ta' riproduzzjoni tar-risultati mistennija minn dejta ppubblikata (24) għal: 1) frekwenzi tal-mutanti b'sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv (inkluzi risponsi dgħajfin) bħal dawk elenkati fit-Tabella 1, nonmutageni, u kontrolli tal-veikolu; u 2) irkupru tat-transġene minn DNA ġenomiku (eż. effiċjenza fl-imballaġġ).

Sekwenzjar tal-mutanti

24. Għal applikazzjonijiet regolatorji, is-sekwenzjar tad-DNA tal-mutanti mhuwiex mehtieg, b'mod partikolari meta jinkiseb rizultat ċar pożittiv jew negattiv. Madankollu, id-dejta tas-sekwejzjar tista' tkun utli meta tkun osservata varjazzjoni għolja bejn l-individwi. F'dawn il-każijiet, is-sekwenzjar jista' jintuża biex jitwarrbu l-possibilitajiet ta' jackpots jew avvenimenti klonali billi jiġi identifikat is-sehem ta' mutanti uniċi minn tessut partikolari. Sekwenzjar għal madwar 10 minuti għal kull tessut għal kull animal għandu jkun bizzejjed għad-determinazzjoni sempliċi ta' jekk il-mutanti klonali jikkontribwixxux għall-frekwenza tal-mutanti; is-sekwenzjar ta'

▼ **M5**

ammont li jasal sa 25 mutant jista' jkun mehtieg biex tigi korretta b'mod matematiku l-frekwenza tal-mutanti għall-klonalità. Is-sekwenzjar tal-mutanti jista' jiġi kkunsidrat ukoll meta jinstabu żidiet żgħir fil-frekwenza tal-mutanti (jiġifieri kemm jinqabzu l-valuri tal-kontroll mhux ikkurat). Differenzi fl-ispettru tal-mutanti bejn il-kolonji tal-mutanti minn annimali kkurati u mhux ikkurati jistgħu jsostnu effett mutageniku (29). Barra minn hekk, l-ispettri ta' mutazzjoni jistgħu jkunu utli għall-iżvilupp ta' ipoteżijiet mekkanistiċi. Meta s-sekwenzjar ikun ser jiġi inkluz bħala parti mill-protokoll tal-istudju, għandha tingħata attenzjoni speċjali fit-tfassil tat-tali studji, b'mod partikolari fir-rigward tan-numru ta' mutanti sekwenzjati għal kull kampjun, biex tinkiseb biżżejjed saħħa skont il-mudell statistiku użat (ara l-paragrafu 43).

PROCEDURA**In-Numru u s-Sess tal-Annimali**

25. In-numru ta' annimali għal kull grupp għandu jkun determinat minn qabel biex ikun biżżejjed halli jipprovi s-saħħa statistika mehtiega biex tal-inqas jiġi identifikat irdoppjar fil-frekwenza tal-mutanti. Id-daqsijiet tal-grupp ser ikunu jikkonsistu f'minimu ta' hames annimali; madankollu, jekk is-saħħa statistika ma tkunx biżżejjed, in-numru ta' annimali għandu jiżdied kif mehtieg. Normalment għandhom jintużaw annimali rġiel. Jista' jkun hemm każijiet li fihom l-ittestjar ta' nisa biss ikun iġġustifikat; pereżempju, meta jiġu ttestjati mediċini speċifiċi għal nisa bnedmin, jew meta jiġi investigat il-metabolizmu speċifiku għan-nisa. Jekk ikun hemm biżżejjed differenzi bejn is-sessi f'termini ta' tossiċità jew metabolizmu, f'dak il-każ ikun hemm bżonn kemm ta' rġiel kif ukoll ta' nisa.

Il-Perjodu tal-Ghoti

26. Fuq il-bażi tal-osservazzjonijiet li l-mutazzjonijiet jakkumulaw ma' kull kura, hemm bżonn ta' skeda b'dożaġġ ripetut, b'kuri ta' kuljum għal perjodu ta' 28 jum. Generalment dan jitqies li huwa aċċettabbli kemm għall-produzzjoni ta' akkumulazzjoni suffiċjenti ta' mutazzjonijiet minn mutageni dgħajfin, kif ukoll għall-ghoti ta' żmien adegwat għall-esponiment sabiex jiġu identifikati mutazzjonijiet f'organi bi proliferazzjoni baxxa. Skedi alternattivi tal-kura jistgħu jkunu xierqa għal ċerti evalwazzjonijiet, u dawn l-iskedi tad-dożaġġ alternattivi għandhom ikunu ġġustifikati xjentifikament fil-protokoll. Il-kuri ma għandhomx ikunu iqsar miż-żmien mehtieg għall-induzzjoni shiħa tal-eżimi metabolizzanti rilevanti kollha, u kuri iqsar jistgħu jkunu jehtieġu l-użu ta' bosta żminijiet tal-kampjunar li jkunu xierqa għal organi b'rati differenti ta' proliferazzjoni. Xorta wahda dejjem għandha tintuża l-informazzjoni kollha disponibbli (eż. dwar it-tossiċità ġenerali jew il-metabolizmu u l-farmakokinetika) meta jiġi ġġustifikat protokoll, speċjalment meta jkun hemm devjazzjoni mir-rakkomandazzjonijiet standard ta' hawn fuq. Filwaqt li jistgħu jżidu s-sensittività, durati tal-kura itwal minn 8 ġimgħat għandhom jiġu spjegati b'mod ċar u ġġustifikati, peress li żminijiet itwal tal-kura jistgħu jipproduċu zieda apparenti fil-frekwenza tal-mutanti permezz ta' espansjoni klonali (29).

Livelli tad-Doża

27. Il-livelli tad-doża għandhom ikunu bbażati fuq ir-riżultati ta' studju ta' sejbien tal-medda tad-doża li jkejjel it-tossiċità ġenerali li nġhatat mill-istess rotta ta' esponiment, jew fuq ir-riżultati ta' studji preżistenti dwar it-tossiċità sottoakuta. Jistgħu jintużaw annimali mhux transġeniċi tal-istess razza ta' rodituri għad-determinazzjoni tal-medda tad-doża. Fit-test ewlieni, sabiex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rispons għad-doża, studju shiħ għandu jinkludi grupp tal-kontroll negattiv (ara l-paragrafu 22) u tal-inqas tliet livelli

▼ **M5**

tad-doża b'intervalli xierqa, hlief meta tkun intużat id-doża limitu (ara l-paragrafu 28). L-oghla doża ghandha tkun id-Doża Massima Tollerata (MTD). L-MTD hija definita bhala d-doża li tipproduċi sinjali ta' tossiċità b'tali mod li livelli oghla tad-doża, fuq il-bażi tal-istess skeda tad-dożaġġ, jipproduċu letalità. Is-sustanzi kimiċi b'attivitajiet bijoloġiċi speċifiċi f'doži mhux tossiċi baxxi (bħal ormoni u mitogeni), u sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni ta' proprjetajiet tossikokinetiċi jistghu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' tfassil tad-doži u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ. Il-livelli tad-doża użati għandhom ikopru medda mill-massimu sa tossiċità baxxa jew inezistenti.

Test tal-limitu

28. Jekk esperimenti dwar is-sejbien tal-medda tad-doża, jew dejta eżistenti minn razez ta' roditori relatati, jindikaw li skeda tal-kura ta' tal-inqas id-doża limitu (ara iktar 'l isfel) ma tipproduċi ebda effetti tossiċi osservabbli, u jekk ma tkunx mistennija ġenotossiċità fuq il-bażi ta' dejta minn sustanzi kliniċi strutturalment relatati, f'dak il-każ jista' ma jitqiesx li hemm bżonn ta' studju shiħ billi jintużaw tliet livelli tad-doża. Għal perjodu tal-ghoti ta' 28 jum (jiġifieri 28 kura ta' kuljum), id-doża limitu hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi tal-ghoti ta' 14-il jum jew inqas, id-doża limitu hija ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum (l-iskedi tad-dożaġġ li jvarjaw minn 28 kura ta' kuljum għandhom jiġu ġġustifikati b'mod xjentifiku fil-protokoll; ara l-paragrafu 26).

L-Ghoti tad-Doži

29. Normalment, is-sustanza kimika tat-test tingħata b'gavage billi jintuża tubu fl-istonku jew kannula xierqa ta' intubazzjoni. B'mod ġenerali, meta jitfassal assaġġ għandha tiġi kkunsidrata r-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem. Għalhekk, rotot oħrajn ta' esponiment (bħal ilma tajjeb għax-xorb, taht il-ġilda, ġol-vina, topikali, tehid man-nifs, intratrakeali, mad-dieta, jew impjant) jistghu jkunu aċċettabbli meta jkunu jistghu jiġu ġġustifikati. Tilqima intraperitoneali mhijiex rakkomandata peress li mhijiex rotta fiżjoloġikament rilevanti ta' esponiment tal-bniedem. Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew tilqima f'darba wahda jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum ma għandux jaqbeż iż-2 ml/100 g piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi oghla minn dan għandu jiġi ġġustifikat. Hlief għal sustanzi kimiċi irritanti jew korrużivi, li normalment juru effetti mgħarrqin f'koncentrazzjonijiet oghla, il-varjabbiltà fil-volum tat-test għandha tiġi minimizzata billi tiġi aġġustata l-koncentrazzjoni halli jiġi żgurat volum kostanti fil-livelli kollha tad-doża.

Żmien tal-Kampjunar*Ċelloli Somatiċi*

30. Iż-żmien tal-kampjunar huwa varjabbli kritiku għaliex huwa ddeterminat mill-perjodu mehtieġ sabiex il-mutazzjonijiet jiġu fissi. Dan il-perjodu huwa speċifiku għat-tessut u jidher li huwa relatat mal-hin tad-dawran tal-popolazzjoni taċ-ċelloli, bil-mudullun tal-ghadam u l-intestin li għandhom ripsons rapidu u l-fwied ferm inqas. Kompromess xieraq għall-kejl ta' frekwenzi mutanti kemm f'tessuti bi proliferazzjoni rapida kif ukoll dawk bi proliferazzjoni iktar bil-mod huwa kuri kuljum għal 28 jum konsekuttiv (kif indikat fil-paragrafu 26) u kampjunar tliet ijiem wara l-aħħar kura; għad li l-frekwenza massima tal-mutanti tista' ma tfeġġx f'tessuti bi proliferazzjoni bil-mod f'dawn il-kundizzjonijiet. Jekk it-tessuti bi proliferazzjoni bil-mod ikunu ta' importanza partikolari, f'dak il-każ żmien tal-kampjunar iktar tard ta' 28 jum wara l-perjodu tal-ghoti ta' 28 jum jista' jkun iktar adattat (16)(29). F'xi każijiet, iż-żmien tal-kampjunar iktar tard jiehu post iż-żmien ta' kampjunar ta' 3 ijiem, u jkun jehtieġ ġustifikazzjoni xjentifika.

▼ M5

Ċelloli ġerminali

31. L-assaġġi ta' TGR huma adattati għall-istudju tal-induzzjoni tal-mutazzjoni tal-ġeni f'ċelloli ġerminali fl-irġiel (7)(8)(27), li fihom it-twaqqit u l-kinetika tal-ispermatoġenesi ġew definiti sew (27). In-numri inferjuri ta' ova disponibbli għal analiżi, anki wara superovulazzjoni, u l-fatt li ma hemm ebda sintesi tad-DNA fl-oocite, jipprekludu d-determinazzjoni tal-mutazzjoni f'ċelloli ġerminali tan-nisa bl-użu ta' assaġġi transġenici (31).
32. Iz-zminijiet tal-kampjunar għaċ-ċelloli ġerminali tal-irġiel għandhom jingħazlu b'tali mod li jittiehed kampjun tal-medda tat-tipi ta' ċelloli esposti fi hdan l-izvilupp taċ-ċelloli ġerminali, u b'hekk l-istadju fil-mira fil-kampjunar ikun ġie espost bizzżejjed. Iz-zmien għall-progressjoni taċ-ċelloli ġerminali li qed jiżviluppaw minn ċelloli staminali spermatogonjali sa sperma matura li tilhaq il-vas deferens/epididimi cauda huwa ta' ~49 jum għall-grieden (36) u ~70 jum għall-firien (34)(35). Wara esponiment għal 28 jum b'perjodu ta' kampjunar sussegwenti ta' tliet ijiem, l-isperma akkumulata miġbura mill-vas deferens/epididimi cauda (7)(8) ser tirrappreżenta popolazzjoni ta' ċelloli esposti matul madwar il-fażi ahħarija tal-ispermatoġenesi, li tinkludi l-perjodu mejotiku u postmeiotiku, iżda mhux il-perjodu spermatogonjali jew taċ-ċelloli staminali. Sabiex jittiehed kampjun adegwat taċ-ċelloli fil-vas deferens/epididimi cauda li kienu ċelloli staminali spermatogonjali matul il-perjodu tal-esponiment, hemm bżonn ta' żmien addizzjonali tal-kampjunar ta' tal-inqas 7 ġimghat (grieden) jew 10 ġimghat (firien) wara li tintemm il-kura.
33. Ċelloli estrużi minn tubuli seminiferużi wara skeda ta' 28 + 3 ijiem jinvolvu popolazzjoni mhallta arrikkita għall-istadji kollha taċ-ċelloli ġerminali fil-fażi tal-izvilupp (7)(8). Il-kampjunar ta' dawn iċ-ċelloli għall-identifikazzjoni tal-mutazzjoni tal-ġeni ma jipprovdi valutazzjoni preċiża tal-istadji li fihom jiġu indotti l-mutazzjonijiet taċ-ċelloli ġerminali daqs kemm tista' tinkiseb mill-kampjunar tal-ispermatozoa mill-vas deferens/epididimi cauda (peress li hemm medda ta' tipi ta' ċelloli ġerminali kampjunati mit-tubuli, u ser ikun hemm xi ċelloli somatiċi li jikkontaminaw din il-popolazzjoni ta' ċelloli). Madankollu, il-kampjunar ta' ċelloli minn tubuli seminiferużi minbarra l-ispermatozoa mill-vas deferens/epididimi cauda wara skeda ta' kampjunar ta' 28 + 3 jum biss jipprovdi ċerta kopertura taċ-ċelloli esposti tul il-maġġoranza tal-fażijiet tal-izvilupp taċ-ċelloli ġerminali, u jista' jkun utli għall-identifikazzjoni ta' xi mutageni taċ-ċelloli ġerminali.

Osservazzjonijiet

34. Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess hin(ijiet) kuljum u jiġi kkunsidrat il-perjodu bl-ogħla livell ta' effetti anticipati wara d-dożaġġ. Il-kundizzjoni tas-saħħa tal-annimali għandha tiġi rreġistrata. Tal-inqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. L-annimali kollha għandhom jintiżnu tal-inqas darba fil-ġimgha, u fis-sagrificċju. Il-kejliet tal-konsum tal-ikel għandu jsir tal-inqas darba kull ġimgha. Jekk is-sustanza tat-test tingħata permezz tal-ilma tajjeb għax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimgha. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossiċità eċċessiva għandhom jiġu ewtanizzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar (23).

▼ M5

Ġbir tat-Tessuti

35. Ir-raġuni għall-ġbir tat-tessuti għandha tkun definita biċ-ċar. Peress li mhuwiex possibbli li tiġi studjata l-induzzjoni tal-mutazzjoni fi prattikament l-ebda studju, l-għażla tat-tessuti li għandhom jingabru għandha tkun imsejja fuq ir-raġuni għat-twettiq tal-istudju u kwalunkwe dejta eżistenti dwar mutageniċità, karċinoġeniċità jew tossiċità għas-sustanza kimika investigata. Fatturi importanti li għandhom jiġu kkunsidrati għandhom jinkludu r-rotta tal-amministrazzjoni (fuq il-bażi tar-rotta/rotot probabbli ta' esponiment għall-bniedem), id-distribuzzjoni mbassra tat-tessuti, u l-mekkaniżmu ta' azzjoni possibbli. Fin-nuqqas ta' kwalunkwe informazzjoni ta' sfond, għandhom jingabru bosta tessuti somatiċi li jistgħu jkunu ta' interess. Dawn għandhom jirrappreżentaw tessuti bi proliferazzjoni rapida, bi proliferazzjoni bil-mod, u tas-sit ta' kuntatt. Barra minn hekk, għandhom jingabru u jinħażnu spermatozoa mill-vas deferens/epididimi cauda u ċelloli ġerminali fil-fażi tal-iżvilupp mit-tubuli seminiferużi (kif deskritti fil-paragrafi 32 u 33) fil-każ li fil-ġejjieni jkun hemm bżonn ta' analiżi tal-mutageniċità taċ-ċelloli ġerminali. Għandhom jinkisbu l-piżijiet tal-organi, u għall-organi l-kbar, għandha tingabar l-istess zona mill-annimali kollha.

Il-Hżin tat-Tessuti u d-DNA

36. It-tessuti (jew omoġenati tat-tessuti) għandhom jinħażnu f' 70 °C jew inqas u jintużaw għall-iżolament tad-DNA fi żmien 5 snin. DNA iżolat, maħzun imkessah f' 4 °C f'bafer xieraq, għandu jintuża b'mod ottimali għall-analiżi tal-mutazzjoni fi żmien sena.

Għażla tat-Tessuti għal Analiżi tal-Mutanti

37. L-għażla tat-tessuti għandha tkun ibbażata fuq kunsiderazzjonijiet bħal: 1) ir-rotta tal-amministrazzjoni jew is-sit tal-ewwel kuntatt (eż. l-istonku glandolari jekk l-ghoti jsir b'mod orali, il-fwied jekk l-ghoti jsir bit-tehid manifs, jew il-ġilda jekk intużat applikazzjoni topikali); u 2) parametri farmakokinetiċi osservati fi studji dwar it-tossiċità ġenerali, li jindikaw dispożizzjoni żamma jew akkumulazzjoni ta' tessut, jew l-organi fil-mira għat-tossiċità. Jekk l-istudji jsiru bħala segwitu għal studji dwar il-karċinoġeniċità, għandhom jiġu kkunsidrati t-tessuti fil-mira għall-karċinoġeniċità. L-għażla tat-tessuti għal analiżi għandha timmassimizza l-identifikazzjoni ta' sustanzi kimiċi li huma mutageni *in vitro* li jaġixxu b'mod dirett, metabolizzati malajr, ferm reattivi jew ftit li xejn assorbiti, jew daww li għalihom it-tessut fil-mira huwa determinat mir-rotta tal-amministrazzjoni (6).
38. Fin-nuqqas ta' informazzjoni ta' sfond u filwaqt li jittiehed f'kunsiderazzjoni s-sit ta' kuntatt dovut għar-rotta tal-amministrazzjoni, il-fwied u tal-inqas tessut wieħed b'divizzjoni rapida (eż. stonku glandolari, mudullun tal-ghadam) għandhom jiġu evalwati għal mutageniċità. F'hafna każijiet, ir-reqqiet ta' hawn fuq jistgħu jinkisbu mill-analiżi ta' żewġ tessuti magħżulin bir-reqqa, iżda f'xi każijiet, ikun hemm bżonn tlieta jew iktar. Jekk hemm raġunijiet għal thassib speċifiku dwar l-effetti taċ-ċelloli ġerminali, inkluzi risponsi pożittivi f'ċelloli somatiċi, it-tessuti taċ-ċelloli ġerminali għandhom jiġu evalwati għal mutazzjonijiet.

Metodi tal-Kejl

39. Metodi standard tal-laboratorju jew ippubblikati għall-identifikazzjoni ta' mutanti huma disponibbli għall-mudelli transġeniċi rakkomandati: batterjo-fago lambda u plazmidi *lacZ* (30); ġrieden *lacI* (2)(18); ġrieden *gpt* delta (22); firien *gpt* delta (28); *cII* (17). Il-modifiki għandhom jiġu ġġustifikati u dokumenti kif xieraq. Id-dejta minn imballaġġi multipli tista' tiġi aggregata u tintuża biex jintlaħaq numru adegwat ta' plakek jew kolonji. Madankollu, il-bżonn ta' numru iktar ta' reazzjonijiet tal-imballaġġ biex jintlaħaq in-numru xieraq ta' plakek jista' jkun indikazzjoni ta' kwalità batuta tad-DNA. F'dawn il-każijiet, id-dejta għandha tiġi kkunsidrata bir-reqqa għaliex tista' ma tkunx affidabbli. In-numru totali ottimali ta' plakek jew kolonji

▼M5

għal kull kampjun tad-DNA huwa rregolat mill-probabilità statistika ta' identifikazzjoni ta' biżżejjed numri ta' mutanti bi frekwenza partikolari ta' mutanti spontanji. B'mod ġenerali, hemm bżonn ta' minimu ta' 125 000 sa 300 000 plakka jekk il-frekwenza ta' mutanti spontanji tkun fl-ordni ta' 3×10^{-5} (15). Għall-assaġġ *lacI* Big Blue®, huwa importanti li jintwera li l-medda shiħa ta' fenotipi tal-kulur tal-mutanti tista' tiġi identifikata permezz tal-inkluzjoni ta' kontrolli tal-kulur xierqa konkurrenti ma' kull platt. It-tessuti u l-kampjuni riżultanti (oġġetti) għandhom jiġu pproċessati u analizzati billi jintuza disinn blokk, li fihom l-oġġetti mill-grupp tal-kontroll tal-veikolu/tas-solvent, il-grupp tal-kontroll pożittiv (jekk jintuza) jew id-DNA tal-kontroll pożittiv (fejn xieraq), u l-gruppi kollha tal-kura huma pproċessati flimkien.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-Riżultati

40. Dejta dwar l-annimali individwali għandha tiġi pprezentata f'forma ta' tabelli. L-unità sperimentali hija l-annimal. Ir-rapport għandu jinkludi n-numru totali ta' unitajiet li jiffurmaw plakka (pfu) jew unitajiet li jiffurmaw kolonja (cfu), in-numru ta' mutanti, u l-frekwenza tal-mutanti għal kull tessut minn kull annimal. Jekk hemm bosta reazzjonijiet tal-imballaġġ/salvataġġ, għandu jiġi rrapportat in-numru ta' reazzjonijiet għal kull kampjun tad-DNA. Filwaqt li d-dejta għal kull reazzjoni individwali għandha tinzamm, il-pfu jew is-cfu biss iridu jiġu rrapportati. Għandha tiġi rrapportata d-dejta dwar it-tossiċità u s-sinjali kliniċi skont il-paragrafu 34. Kwalunkwe riżultat ta' sekwenzjar għandu jiġi pprezentat għal kull mutant analizzat, u għandhom jintwerew il-kalkoli tal-frekwenza tal-mutazzjoni li rriżultaw għal kull annimal u tessut.

Evalwazzjoni Statistika u Interpretazzjoni tar-Riżultati

41. Hemm diversi kriterji għad-determinazzjoni ta' riżultat pożittiv, bħal zieda relatata mad-doża fil-frekwenza tal-mutanti, jew zieda ċara fil-frekwenza tal-mutanti fi grupp ta' doża wieheda meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll tas-solvent/veikolu. Tal-inqas tliet gruppi tad-doża kkurati għandhom jiġu analizzati sabiex tiġi pprovduta biżżejjed dejta għal analiżi tar-rispons għad-doża. Filwaqt li r-relevanza bijoloġika tar-riżultati għandha tkun il-kunsiderazzjoni primarja, jistgħu jintużaw metodi statistiċi xierqa bħala għajnuna fl-evalwazzjoni tar-riżultati tat-test (4)(14)(15)(25)(26). It-testijiet statistiċi użati għandhom jikkunsidraw l-annimal bħala l-unità sperimentali.
42. Sustanza kimika tat-test li għaliha r-riżultati ma jissodisfawx il-kriterji ta' hawn fuq fi kwalunkwe tessut titqies mhux mutaġenika f'dan l-assaġġ. Għal relevanza bijoloġika ta' riżultat negattiv, l-esponiment għat-tessut għandu jiġi kkonfermat.
43. Għal analiżijiet tas-sekwenzjar tad-DNA, hemm disponibbli għadd ta' approċċi statistiċi biex jassistu fl-interpretazzjoni tar-riżultati (1)(5)(9)(19).
44. Kunsiderazzjoni ta' jekk il-valuri osservati humiex fi hdan jew barra l-medda ta' kontroll storiku tista' tipprovdi gwida meta tiġi evalwata s-sinifikanza bijoloġika tar-rispons (32).

▼ **M5****Rapport tat-test**

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

Sustanza kimika tat-test:

- id-dejta ta' identifikazzjoni u n-nru tas-CAS, jekk ikunu magħrufin,
- is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli,
- l-ghamla fiżika u l-purità,
- il-proprietajiet fiżjokimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju,
- l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test, jekk magħrufa.

Solvent/veikolu:

- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tal-veikolu,
- is-solubilità u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħruf,
- il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet djetetiċi, tal-ilma tajjeb għax-xorb jew tat-tehid man-nifs,
- id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż., l-istabbiltà, l-omoġenità, il-koncentrazzjonijiet nominali).

Animali tat-test:

- l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjoni għall-għażla,
- in-numru, l-età u s-sess tal-annimali,
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-post tat-trobbija, id-dieta, eċċ.,
- il-piż individwali tal-annimali fil-bidu tat-test, inklużi l-medda tal-piż tal-ġisem, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

- dejta tal-kontroll pożittiv u negattiv (veikolu/solvent),
- dejta mill-istudju ta' sejbien tal-medda,
- ir-raġuni għall-għażla tal-livell tad-doża,
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test,
- dettalji dwar l-ġoti tas-sustanza kimika tat-test,
- ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni,
- metodi għall-kejl tat-tossicità tal-annimali, inklużi, fejn disponibbli, l-analizijiet istopatoloġiċi jew ematoloġiċi u l-frekwenza li biha saru l-osservazzjonijiet u tiegħu l-piżijiet tal-ġisem tal-annimali,
- metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test laqget it-tessut fil-mira, jew ċirkolazzjoni ġenerali, jekk inkisbu riżultati negattivi,

▼ **M5**

- id-doża propja (mg/kg piż tal-gisem/jum) ikkalkolata mill-koncentrazzjoni u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tajjeb ghax-xorb (ppm), jekk applikabbli,
- dettalji dwar il-kwalità tal-ikel u l-ilma,
- deskrizzjoni dettaljata tal-iskedi tal-kura u l-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-ghazliet,
- il-metodu tal-ewtanazja,
- il-proċeduri għall-izolament u l-preservazzjoni tat-tessuti,
- il-metodi għall-izolament tad-DNA ġenomiku tar-roditori, b'salvataġġ tat-transġene minn DNA ġenomiku, u t-trasferiment ta' DNA transġeniku għal ospitant batterjali,
- is-sors u n-numri tal-lott taċ-ċelloli, il-kitts u r-reagenti kollha (fejn applikabbli),
- il-metodi għall-enumerar tal-mutanti,
- il-metodi għall-analiżi molekolari tal-mutanti u l-użu fil-korrezzjoni għall-klonalità u/jew il-kalkolu tal-frekwenzi tal-mutazzjoni, jekk applikabbli.

Riżultati:

- il-kundizzjoni tal-annimali qabel u matul il-perjodu tat-test, inklużi sinjali tat-tossiċità,
- il-piżijiet tal-gisem u l-organi fis-sagrifiċċju,
- għal kull tessut/animal, in-numru ta' mutanti, in-numru ta' plakek jew kolonji evalwati, il-frekwenza tal-mutanti,
- għal kull grupp ta' tessuti/annimali, in-numru ta' reazzjonijiet tal-imballaġġ għal kull kampjun tad-DNA, in-numru totali ta' mutanti, il-frekwenza medja tal-mutanti, id-devjazzjoni standard,
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn possibbli,
- għal kull tessut/animal, in-numru ta' mutanti indipendenti u l-frekwenza medja tal-mutazzjoni, fejn saret analiżi molekolari tal-mutazzjonijiet,
- dejta ta' kontroll negattiv konkurrenti u storiku b'meded, medji u devjazzjonijiet standard,
- dejta ta' kontroll pożittiv konkurrenti (jew kontroll pożittiv tad-DNA mhux konkurrenti),
- determinazzjonijiet analitiċi, jekk disponibbli (eż. konċentrazzjonijiet tad-DNA użati fl-imballaġġ, dejta dwar is-sekwenzjar tad-DNA),
- l-analiżijiet statistiċi u l-metodi applikati.

*Diskussjoni tar-riżultati**Konklużjoni*

▼ M5

TAGHRIF

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657-659
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.
- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971-7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for *lacZ*-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, **705**: 96-106.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼M5

- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing', *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212–218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', *Carcinogenesis*, 29(4): 772–778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi — and 6-thioguanine Selections', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465–470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi — Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.
- (23) 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, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Parigi.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Parigi.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231–245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', *Mutation. Res.*, 388(2–3): 249–289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', *Mutation. Res.*, 598: 164–193.
- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71–78.
- (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540: 141–151.
- (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, Stati Uniti, pp. 391–410.

▼ **M5**

- (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
- (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
- (33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Parigi.
- (34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
- (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, il-Pajjizi l-Baxxi, pp. 1071-1148.
- (36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', *Genetica*, 122: 25-36.

▼ **M5***Appendiċi*

DEFINIZZJONIJIET:

Perjodu ta' għoti: il-perjodu totali li matulu annimal jingħata d-doża.

Sostituzzjoni ta' pari bażi: tip ta' mutazzjoni li tikkaġuna s-sostituzzjoni ta' bażi tan-nukleotid tad-DNA ma' bażi oħra tan-nukleotid tad-DNA.

Kapsida: il-qoxra tal-proteina li tiksi partikula ta' vajrus.

Sustanza kimika: sustanza jew tahlita.

Espansjoni klonali: il-prodzzjoni ta' hafna ċelloli minn ċellola (mutanti) waħda.

Unità li tiffirma kolonja (cfu): kejl ta' numri batterjali vijabbli.

Konkatameru: bijomolekola kontinwa twila msawra minn diversi kopji identiċi marbutin f'serje.

Sit tal-cos: segment ta' 12-nukleotid ta' DNA b'filament wiehed li jeżisti fiż-żewġ itruf tal-ġenoma b'żewġ filamenti tal-lambda batterjofago.

Thassir: mutazzjoni li fiha jintilef nukleotid (sekwenzjali) wiehded jew iktar mill-ġenoma.

Elettroporazzjoni: l-applikazzjoni ta' polsazzjonijiet elettrici biex tiżdied il-permeabbiltà tal-membrani taċ-ċelloli.

Ġene endoġenu: gene nattiv għall-ġenoma.

Varjazzjoni extrabinomjali: varjabbiltà ikbar fi stimi ripetuti ta' sehem tal-popolazzjoni minn dik li tkun mistennija jekk il-popolazzjoni kellha distribuzzjoni binomjali.

Mutazzjoni ta' bdil tal-qafas: mutazzjoni ġenetika kkaġunata minn tidhilet jew thassiriet ta' numru ta' nukleotidi li ma jistax jinqasam b'mod shih minn tlieta fi hdan sekwenza tad-DNA li jikkodifika għal proteina/peptid.

Tidhil: iż-żieda ta' par bażi ta' nukleotid wiehed jew iktar f'sekwenza tad-DNA.

Jackpot: numru kbir ta' mutanti li feġġu permezz ta' espansjoni klonali minn mutazzjoni waħda.

Thassiriet kbar: thassiriet fid-DNA ta' iktar minn bosta kilobazijiet (li effettivament jiġu identifikati bl-għażla ta' Spi⁻ u l-assaġġi ta' plazmidi lacZ).

Ligazzjon: il-kovalenti li jorbtu żewġ itruf ta' molekoli tad-DNA li jużaw ligazi tad-DNA.

Mitoġen: sustanza kimika li tistimola ċellola biex tibda diviżjoni taċ-ċelloli, li twassal għal mitożi (jiġifieri diviżjoni taċ-ċelloli).

Ġene newtrali: ġene li mhuwiex affettwat minn pressjonijiet selettivi pożittivi jew negattivi.

Imballaġġ: is-sintezi ta' partikuli fago infettivi minn preparazzjoni ta' kapsida fago u proteini tad-denb u konkatameru ta' molekuli fago tad-DNA. Użati spiss għall-imballaġġ ta' DNA kklonat f'vettur lambda (separat minn siti ta' cos) f'partikuli lambda infettużi.

Effiċjenza tal-imballaġġ: l-effiċjenza li biha l-batterjofagi mballaġġati huma rkuprati f'batterji ospitanti.

▼ **M5**

Unità li tiffirma plaquek (pfu): kejl tan-numri batterjofagi vijabbli.

Mutazzjoni tal-punt: terminu ġenerali għal mutazzjoni li taffettwa biss sekwenza żgħira ta' DNA inklużi tidhillet żgħar, thassiriet, u sostituzzjonijiet ta' pari bażi.

Għażla pożittiva: metodu li jippermetti mutanti biss sabiex jibqgħu hajjin.

Ġene rapportatur: ġene li l-prodott tal-ġene mutanti tiegħu huwa identifikat malajr.

Żmien tal-kampjunar: tmiem il-perjodu ta' żmien, qabel is-sagrificċju, li matulu s-sustanza kimika ma tinghatax u li matulha l-leżjonijiet mhux ipproċessati tad-DNA huma fissi f'mutazzjonijiet stabbli.

Vettur shuttle: vettur mibni sabiex ikun jista' jistaghna f'zewġ speċi ospitanti differenti; skont dan, id-DNA mdahħal f'vettur shuttle jista' jiġi ttestjat jew immanipolat f'zewġ tipi ta' ċelloli differenti jew żewġ organiżmi differenti.

Sustanzaz kimika tat-test: kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata billi jintuża dan il-metodu ta' ttestjar.

Transġeniku: ta', relatat ma', jew li huwa organiżmu li l-ġenoma tiegħu hija alterata mit-trasferiment ta' ġene jew ġeni minn speċijiet ohrajn.

▼ M7

B.59. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA IN CHEMICO: ASSAĠĠ DIRETT TAR-REATTIVITÀ TAL-PEPTIDI (DPRA)**INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 442C tal-OECD (2015). Sensitizzatur tal-ġilda jirreferi għal sustanza li sejra twassal għal reazzjoni allergika wara kuntatt mal-ġilda kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) (1). Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi proċedura *in chemico* (Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi — DPRA) li tintuża sabiex tappoġġja d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda skont il-GHS tan-NU u s-CLP.

Hemm qbil ġenerali dwar l-avvenimenti bijoloġiċi ewlenin li jwasslu għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-għarfien eżistenti dwar il-mekkanizmi kimiċi u bijoloġiċi assoċjati mas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ngabar fil-forma ta' Passaġġ tal-Ezitu Avvers (AOP) (2), mill-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari permezz tal-avvenimenti intermedji għall-effett avvers, jiġifieri dermatite b'kuntatt allergiku fil-bniedem jew ipersensittività b'kuntatt f'produturi. Fi hdan l-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, l-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari huwa l-irbit kovalenti ta' sustanzi elettrofiliċi ma' ċentri nukleofiliċi fil-proteini tal-ġilda.

Normalment, il-valutazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju. Il-metodi klassiċi bbażati fuq fniek tal-indi, it-Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek tal-Indi ta' Magnusson Kligman (GMPT) u t-Test Buehler (TM B.6 (3)), jistudjaw kemm il-fażi tal-induzzjoni kif ukoll il-fażi tal-elicitazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. Test murin, l-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi (LLNA, TM B.42 (4)) u ż-żewġ modifiki mhux radjuattivi tiegħu, LLNA: DA (TM B.50 (5)) u LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), li lkoll jivvalutaw ir-rispons tal-induzzjoni b'mod esklussiv, ġew aċċettati wkoll peress li jagħtu vantaġġ fuq it-testijiet fuq il-hnieżer tal-indi f'termini tat-trattament xieraq tal-annimali u kejl oġġettiv tal-fażi tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Iktar riċentement, metodi ta' ttestjar *in chemico* u *in vitro* bbażati mekkanistikament tqiesu xjentifikament validi għall-evalwazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet ta' metodi mhux tal-annimali (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) fi hdan Approċċi Integrati għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni (IATA) sejrjn ikunu mehtieġa sabiex ikunu sostitwiti bis-shih it-testijiet fuq l-annimali li jintużaw bħalissa fid-dawl tal-kopertura mekkanistika ristretta tal-AOP ta' kull wiehed mill-metodi ta' ttestjar mhux fuq l-annimali li għandna għad-dispożizzjoni bħalissa (2) (7).

Id-DPRA huwa propost sabiex jindirizza l-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, jiġifieri r-reattività tal-proteina, billi jikkwantifika r-reattività tas-sustanzi kimiċi tat-test lejn peptidi sintetiċi mudell li fihom lizina jew cisteina (8). Imbagħad, il-valuri perċentwali ta' tnaqqis tal-peptidi taċ-cisteina u l-lizina jintużaw sabiex sustanza titqassam f'wahda mill-erba' klassijiet ta' reattività għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda (9).

(1) 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

▼ M7

Id-DPRA gie evalwat fi studju ta' validazzjoni mmexxi mil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea ghal Alternattivi ghal Testijiet fuq l-Annimali (EURL ECVAM) u revizzjoni bejn il-pari indipendenti sussegwenti mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-EURL ECVAM (ESAC) u tqies li huwa xjentifikament validu (10) sabiex jintuża bħala parti minn IATA għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda għall-fini ta' klassifikazzjoni u tikkettar tal-periklu. Eżempji dwar l-użu tad-dejta tad-DPRA flimkien ma' informazzjoni oħra huma rrapportati fit-tagħrif (11) (12) (13) (14).

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi I.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI, APPLIKABILITÀ U LIMITAZZJONIJIET

Il-korrelazzjoni tal-attività tal-proteini mal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda hija ferm stabbilita (15) (16) (17). Minkejja dan, peress li l-irbit tal-proteina jirrappreżenta avveniment ewlieni wiehed biss, li huwa l-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, informazzjoni dwar irreattività tal-proteina ġġenerata b'metodi ta' ttestjar u mhux ta' ttestjar jaf ma tkunx biżżejjed wahedha sabiex tinhareġ konklużjoni dwar in-nuqqas ta' potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Għaldaqstant, dejta ġġenerata b'dan il-metodu ta' ttestjar għandha tiġi kkunsidrata fil-kuntest ta' approċċi integrati bħall-IATA, biex b'hekk tiġi kombinata ma' informazzjoni komplimentari oħra, eż. derivata minn assaġġi *in vitro* li jindirizzaw avvenimenti ewlenin oħrajn tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kif ukoll metodi mhux ta' ttestjar inkluż read-across minn analogi kimiċi.

Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża, flimkien ma' informazzjoni komplimentari oħra, sabiex jappoġġja d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/CLP) u mhux sensitizzaturi fil-kuntest tal-IATA. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jintuża wahdu, lanqas sabiex jiġu sottokategorizzati sensitizzaturi tal-ġilda f'sottokategoriji 1A u 1B kif definiti mill-GHS/CLP tan-NU, u lanqas sabiex titbassar il-potenza għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjoni tas-sikurezza. Madankollu, skont il-qafas regolatorju, riżultat pożittiv bid-DPRA jista' jintuża wahdu sabiex sustanza kimika tiġi klassifikata fil-kategorija 1 tal-GHS/CLP tan-NU.

Il-metodu ta' ttestjar tad-DPRA wera li huwa trasferibbli għal laboratorju b'esperjenza f'analizi tal-kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja (HPLC). Il-livell ta' riproducibilità fil-previżjonijiet li jista' jkun mistenni mill-metodu ta' ttestjar huwa fl-ordni ta' 85 % fi hdan il-laboratorji u 80 % bejn il-laboratorji (10). Ir-riżultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (18) u l-istudji ppubblikati (19) b'mod ġenerali jindikaw li l-preċiżjoni tad-DPRA fid-diskriminazzjoni ta' sensitizzaturi (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/CLP) minn mhux sensitizzaturi hija ta' 80 % (N=157) b'sensittività ta' 80 % (88/109) u speċifità ta' 77 % (37/48) meta mqabblin mar-riżultati tal-LLNA. Id-DPRA għandu probabbiltà ikbar li jbassar sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1B tas-CLP/GHS tan-NU) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1A tas-CLP/GHS tan-NU) (18) (19). Madankollu, il-valuri tal-preċiżjoni mogħtijin hawnhekk għad-DPRA bħala metodu ta' ttestjar wahdu huma indikattivi biss peress li l-metodu ta' ttestjar għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħrajn ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafu 9 ta' hawn fuq. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħrajn fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni shiha fl-ispeċi ta' interess, jiġifieri fil-bniedem. Fuq il-bażi tad-dejta kumplessiva disponibbli, intwera li d-DPRA huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, mekkaniżmi ta' reazzjoni, potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u proprjetajiet fizikokimiċi (8) (9) (10) (19). Mehuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tad-DPRA sabiex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

▼ M7

It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f’dan il-metodu ta’ ttestjar sabiex jirreferi għal dak li jkun qiegħed jiġi ttestjat u mhux b’rabta mal-applikabilità tad-DPRA għall-ittestjar ta’ sustanzi u/jew tahlitiet. Dan il-metodu ta’ ttestjar mhuwiex applikabbli għall-ittestjar ta’ komposti tal-metall peress li dawn huma magħrufin li jirreagixxu ma’ proteini b’mekkaniżmi li mhuwiex ta’ rbit kovalenti. Sustanza kimika tat-test għandha tkun solubbli f’solvent xiearq f’koncentrazzjoni finali ta’ 100 mM (ara l-paragrafu 18). Madankollu, is-sustanzi kimiċi tat-test li mhuwiex solubbli f’din il-koncentrazzjoni xorta waħda jistgħu jiġu ttestjati f’koncentrazzjoni solubbli iktar baxxi. F’dan il-każ, xorta waħda jista’ jintuża riżultat pożittiv sabiex isostni l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala sensitizzatur tal-gilda, iżda ma għandha tinhareġ ebda konklużjoni assoluta dwar in-nuqqas ta’ reattività minn riżultat negattiv. Bhalissa hemm biss informazzjoni limitata disponibbli dwar l-applikabilità tad-DPRA għal tahlitiet ta’ kompożizzjoni magħrufa (18) (19). Minkejja dan, id-DPRA jitqies li huwa teknikament applikabbli għall-ittestjar ta’ sustanzi multikostitwenti u tahlitiet b’kompożizzjoni magħrufa (ara l-paragrafu 18). Qabel ma jintuża dan il-metodu ta’ ttestjar fuq tahlita għall-generazzjoni ta’ dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdri riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux mehtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita. Il-mudell ta’ tbassir attwali ma jistax jintuża għal tahlitiet kumplessi b’kompożizzjoni mhux magħrufa jew għal sustanzi b’kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti b’reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi (jiġifieri sustanzi UVCB) minhabba l-proporzjon molar definit tas-sustanza kimika tat-test u l-peptid. Għal dan il-għan, sejjer ikollu jiġi żviluppat mudell ġdid ta’ tbassir imsejjes fuq approċċ gravimetriku. F’każijiet li fihom tista’ tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta’ applikabilità tal-metodu ta’ ttestjar għal kategoriji speċifiċi ta’ sustanzi kimiċi, il-metodu ta’ ttestjar ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi ta’ sustanzi kimiċi.

Dan il-metodu ta’ ttestjar huwa metodu *in chemico* li ma jkoprix sistema metabolika. Sustanzi kimiċi li jehtieġu bijoattivazzjoni enzimatika sabiex jeżerċitaw il-potenzjal tas-sensitizzazzjoni tal-gilda tagħhom (jiġifieri proapteni) ma jistgħux jiġu individwati mill-metodu ta’ ttestjar. Sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi wara trasformazzjoni abiotika (jiġifieri preapteni) huma rrapportati li f’xi każijiet jiġu individwati kif suppost mill-metodu ta’ ttestjar (18). Fid-dawl ta’ dan li ntqal hawn fuq, riżultati negattivi miksubin bil-metodu ta’ ttestjar għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet stipulati u b’rabta ma’ sorsi ta’ informazzjoni oħrajn fi hdan il-qafas ta’ IATA. Sustanzi kimiċi tat-test li ma jorbtux b’mod kovalenti mal-peptid iżda jippromwovu l-ossidazzjoni tiegħu (jiġifieri dimerizzazzjoni taċ-ċisteina) jistgħu jwasslu għal potenzjal ta’ sopravvalutazzjoni tat-tnaqqis tal-peptidi, li jirriżulta fi tbassir possibbli ta’ foloz pożittivi u/jew assenjament għal klassi ta’ reattività oġhla (ara l-paragrafi 29 u 30).

Kif deskritt, id-DPRA jsostni d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-gilda u mhux sensitizzaturi tal-gilda. Madankollu, għandu l-potenzjal li jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta’ sensitizzazzjoni (11) ukoll meta jintuża l’approċċi integrati bħall-IATA. Madankollu, hemm bżonn li jsir iktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta’ dejta mill-bniedem, sabiex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tad-DPRA jistgħu jinformaw valutazzjoni tal-potenza.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Id-DPRA huwa metodu *in chemico* li jikkwantifika l-koncentrazzjoni li jifdal ta’ peptid li fi h-ċisteina jew lizina wara inkubazzjoni ta’ 24 siegħa bis-sustanza kimika tat-test f’ 25 ± 2.5 °C. Il-peptidi sintetiċi fihom fenilalanina sabiex tgħin fl-individwazzjoni. Koncentrazzjoni relattiva ta’ peptidi hija mkejla minn kromatografija likwida bi prestazzjoni għolja (HPLC) b’elwizzjoni gradjenti u detezzjoni tal-UV f’220 nm. Imbagħad, il-valuri tat-tnaqqis fil-perċentwal ta’ peptidi taċ-ċisteina u lizina jiġu kkalkolati u jintużaw f’mudell ta’ tbassir (ara l-paragrafu 29) li jippermettu li s-sustanza kimika tat-test tiġi assenjata għal waħda mill-erba’ klassijiet ta’ reattività għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi u mhux sensitizzaturi.

▼ **M7**

Qabel l-użu ta' rutina tal-metodu ta' ttestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-għaxar sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 2.

PROCEDURA

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll DB-ALM DPRA Nru 154 (20) li jirrappreżenta l-protokoll użat għall-istudju ta' validazzjoni koordinat mill-ECVAM tal-EURL. Huwa rakkomandat li dan il-protokoll jintuża meta jiġi implimentat u jintuża l-metodu fil-laboratorju. Din li ġejja hija deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ewlenin ta' ttestjar għad-DPRA. Jekk jintuża ssettjar alternattiv tal-HPLC, għandha tintwera l-ekwivalenza tiegħu għall-issettjar ivvalutat deskritt fil-protokoll DB-ALM (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2).

Preparazzjoni tal-peptidi li fihom iċ-ċisteina jew il-lizina

Soluzzjonijiet ewlenin ta' ċisteina (Ac-RFAACAA-COOH) u lizina (Ac-RFAAKAA-COOH) li fihom peptidi sintetiċi ta' purità oghla minn 85 % u idealment fil-medda ta' 90-95 %, għandhom jithejjew godda eżatt qabel ma jiġu inkubati mas-sustanza kimika tat-test. Il-konċentrazzjoni finali tal-peptid taċ-ċisteina għandha tkun ta' 0.667 mM f'bafer tal-fosfat b'pH ta' 7.5 filwaqt li l-konċentrazzjoni finali tal-peptid tal-lizina għandha tkun ta' 0.667 mM f'bafer tal-aċetat tal-ammonju b'pH ta' 10.2. Is-sekwenza tas-sessjoni tal-HPLC għandha tiġi stabbilita sabiex il-hin tal-analizi tal-HPLC jinżamm għal inqas minn 30 siegħa. Għall-issettjar tal-HPLC użat fl-istudju ta' validazzjoni u deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, jistgħu jiġu akkomodati sa 26 kampjun tal-analizi (li jinkludu s-sustanza kimika tat-test, il-kontroll pożittiv u n-numru xieraq ta' kontrolli tas-solvent fuq il-bażi tan-numru ta' solventi individwali użati fit-test, ilkoll ittestjati fi triplikati), f'sessjoni waħda tal-HPLC. Ir-repliki kollha analizzati fl-istess sessjoni għandhom jużaw l-istess soluzzjonijiet ewlenin tal-peptid taċ-ċisteina u l-lizina. Huwa rakkomandat li jingħataw provi ta' lottijiet ta' peptidi individwali għas-solubilità xierqa qabel ma jintużaw.

Preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test f'solvent xieraq għandha tiġi vvalutata qabel ma jsir l-assaġġ wara l-proċedura ta' solubilizzazzjoni deskritta fil-protokoll DB-ALM tad-DPRA (20). Solvent xieraq jiddisolvi s-sustanza kimika tat-test għalkollox. Peress li fid-DPRA s-sustanza kimika tat-test tiġi inkubata f'eċċess kbir b'peptidi taċ-ċisteina jew il-peptidi tal-lizina, spezzjoni viżwali tal-ifformar ta' soluzzjoni ċara titqies li hija biżżejjed sabiex jiġi żgurat li giet dissolta s-sustanza kimika tat-test (u l-komponenti kollha tagħha fil-każ ta' ttestjar ta' sustanza jew tahlita multikostitwenti). Solventi xierqa huma aċetonitril, ilma, tahlita 1:1 ilma:aċetonitril, isopropanol, aċeton-aċeton jew tahlita 1:1 aċeton:aċetonitril. Jistgħu jintużaw solventi oħrajn diment li ma jhallux impatt fuq l-istabilità tal-peptid kif issorveljat b'kontrolli ta' referenza C (jiġifieri kampjuni kostitwiti mill-peptid waħdu dissolt fis-solvent xieraq; ara l-Appendiċi 3). Bħala l-aħħar alternattiva, jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fi kwalunkwe wieħed minn dawn is-solventi, għandu jsir tentattiv sabiex tiġi solubilizzata fi 300 µL DMSO u s-soluzzjoni li tirriżulta tiġi dilwita b'2 700 µL ta'

▼ **M7**

aċetonitril u, jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli f'din it-tahlita, għandhom isiru tentattivi sabiex jiġi solubizzat l-istess ammont ta' sustanza kimika tat-test f'1 500 µL DMSO u s-soluzzjoni li jifdal b'1 500 µL ta' aċetonitril. Is-sustanza kimika tat-test għandha tintiżen minn qabel f'kunjetti tal-ħġieġ u tiġi dissolta eżatt qabel l-ittestjar b'solvent xieraq sabiex tithejja soluzzjoni ta' 100 mM. Għal tahlitiet u sustanzi multikostitwenti b'kompożizzjoni magħrufa, purità wahda għandha tiġi stabbilita mis-somma tal-proporzjon tal-kostitwenti tagħha (eskluz l-ilma), u għandu jiġi stabbilit piz molekolari apparenti wiehed billi jiġu kkunsidrati l-piżijiet molekolari individwali ta' kull komponent fit-tahlita (eskluz l-ilma) u l-proporzjonijiet individwali tagħhom. Imbagħad għandhom jintużaw il-purità li tirriżulta u l-piż molekolari apparenti sabiex jiġi kkalkolat il-piż tas-sustanza kimika tat-test neċessarju sabiex tithejja soluzzjoni ta' 100 mM. Għal polimeri li għalihom ma jistax jiġi stabbilit piz molekolari predominanti, il-piż molekolari tal-monomer (jew il-piż molekolari apparenti tal-bosta monomeri li jikkostitwixxu l-polimer) jistghu jiġu kkunsidrati sabiex tithejja soluzzjoni ta' 100 mM. Madankollu, meta jiġu ttestjati tahlitiet, sustanzi multikostitwenti jew polimeri b'kompożizzjoni magħrufa, għandu jiġi kkunsidrat ukoll l-ittestjar tas-sustanza kimika pura. Għal likwidi, is-sustanza kimika pura għandha tiġi ttestjata kif inhi mingħajr ebda dilwizzjoni minn qabel billi tiġi inkubata bi proporzjon molar ta' 1:10 u 1:50 bil-peptidi taċ-ċisteina u l-lizina, rispettivament. Għal solidi, is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi dissolta għall-koncentrazzjoni solubbli massima tagħha fl-istess solvent użat għat-tnejn tas-soluzzjoni apparenti ta' 100 mM. Imbagħad għandha tiġi ttestjata kif inhi mingħajr ebda dilwizzjoni ulterjuri minn qabel billi tiġi inkubata bi proporzjon ta' 1:10 u 1:50 bil-peptidi taċ-ċisteina u l-lizina, rispettivament. Ir-riżultati konkordanti (reattivi jew mhux reattivi) bejn is-soluzzjoni apparenti ta' 100 mM u s-sustanza kimika pura għandhom jippermettu li tinhareġ konkluzjoni ċara fuq ir-riżultat.

Preparazzjoni tal-kontrolli pożittivi, kontrolli ta' referenza u l-kontrolli ta' koelwizzjoni

Aldeid ċinnamiku (CAS 104-55-2; $\geq 95\%$ purità tal-grad tal-ikel) għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv (PC) f'koncentrazzjoni ta' 100 mM fl-aċetonitril. Jistghu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħrajn li idealment jipprovdu valuri ta' tnaqqis fil-medda medja jekk ikun hemm dejta storika disponibbli sabiex jinkisbu kriterji ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni komparabbli. Barra minn hekk, kontrolli ta' referenza (jiġifieri kampjuni li fihom biss il-peptid dissolt fis-solvent xieraq) għandhom ikunu inkluzi wkoll fis-sekwenza tas-sessjoni tal-HPLC u dawn jintużaw sabiex tiġi verifikata l-idoneità tas-sistema tal-HPLC qabel ma ssir l-analiżi (kontrolli ta' referenza A), l-istabilità tal-kontrolli ta' referenza tul iż-żmien (kontrolli ta' referenza B) u sabiex jiġi verifikat li s-solvent użat sabiex tiġi dissolta s-sustanza kimika tat-test ma jhallix impatt fuq il-perċentwal ta' tnaqqis ta' peptidi (kontrolli ta' referenza C) (ara l-Appendiċi 3). Il-kontroll ta' referenza xieraq għal kull sustanza kimika jintuża sabiex jiġi kkalkolat it-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi għal dik is-sustanza kimika (ara l-paragrafu 26). Barra minn hekk, għandu jkun inkluz kontroll tal-koelwizzjoni kostitwit mis-sustanza kimika tat-test wahda għal kull wahda mis-sustanzi kimiċi tat-test analizzati fis-sekwenza tas-sessjoni sabiex tiġi individwata l-koelwizzjoni possibbli tas-sustanza kimika tat-test b'peptid tal-lizina jew taċ-ċisteina.

Inkubazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bis-soluzzjonijiet tal-peptidi taċ-ċisteina u l-lizina

Is-soluzzjonijiet tal-peptidi taċ-ċisteina u l-lizina għandhom jiġu inkubati f'kunjetti tal-ħġieġ tal-awtokampjunar bis-sustanza kimika tat-test bi proporzjon ta' 1:10 u 1:50, rispettivament. Jekk jiġi osservat preċipitat eżatt wara li tiżdied is-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test mas-soluzzjoni tal-peptid, minhabba solubilità milwiema baxxa tas-sustanza kimika tat-test, f'dan il-każ wiehed ma jistax ikun żgur dwar kemm is-sustanza kimika tat-test baqgħet fis-soluzzjoni sabiex tirreagixxi mal-peptid. Għalhekk, f'każ bħal dan, riżultat pożittiv xorta wahda jista' jintuża, iżda riżultat negattiv huwa incert u għandu jiġi interpretat bil-galbu (ara wkoll id-dispożizzjonijiet fil-paragrafu 11 għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi mhux solubbli sa koncentrazzjoni ta' 100 mM). Is-soluzzjoni tar-reazzjoni għandha tithalla fid-dlam f'25 $\pm$ 2.5 °C għal 24 $\pm$ 2 siegħa qabel ma ssir l-analiżi tal-HPLC. Kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi analizzata fi triplikati għaż-żewġ peptidi. Il-kampjuni jridu jiġu spezzjonati viżwalment qabel l-analiżi tal-HPLC. Jekk jiġu osservati preċipitati jew separazzjoni tal-fażi, il-kampjuni jistghu jiġu centrifugati b'veloċità baxxa (100-400xg) sabiex il-preċipitat jiġi mgħieghel għal qiegh il-kunjett bħala prekawzjoni, peress li ammonti kbar ta' preċipitat jistghu jsoddu t-tubi jew il-kolonni tal-HPLC. Jekk tiġi osservata preċipitazzjoni jew separazzjoni tal-fażi wara l-perjodu ta' inkubazzjoni, it-tnaqqis tal-peptidi jista' jiġi sottovalutat u ma tistax tinhareġ konkluzjoni dwar in-nuqqas ta' reattività b'biżżejjed kunfidenza fil-każ ta' riżultat negattiv.

▼ **M7****Preparazzjoni tal-kurva ta' kalibrizzjoni standard tal-HPLC**

Kurva ta' kalibrizzjoni standard għandha tiġi ġġenerata kemm għall-peptidi taċ-ċisteina kif ukoll tal-lizina. L-istandards tal-peptidi għandhom jithejjew f'soluzzjoni ta' 20 % jew 25 % aċetonitril; bafer li juża bafer tal-fosfat (pH 7.5) għall-bafer tal-aċetat tal-ammonju u l-peptid taċ-ċisteina (pH 10.2) għall-peptid tal-lizina. L-użu ta' standards ta' dilwizzjoni serjali tas-soluzzjoni ewlenija tal-peptid (0,667 mM), 6 soluzzjonijiet tal-kalibragg għandhom jithejjew sabiex ikopru l-medda minn 0.534 sa 0.0167 mM. Inbjank tal-bafer ta' dilwizzjoni għandu jkun inkluz ukoll fil-kurva ta' kalibrizzjoni standard. Il-kurvi ta' kalibrizzjoni xierqa għandu jkollhom $r^2 > 0.99$.

Preparazzjoni u analiżi tal-HPLC

L-idoneità tas-sistema tal-HPLC għandha tiġi vverifikata qabel ma ssir l-analiżi. It-tnaqqis tal-peptidi jiġi ssorveljat mill-HPLC flimkien ma' detettur tal-UV (detettur b'serje ta' fotodijodi jew detettur tal-assorbiment tat-tul ta' mewġa fiss b'sinjal ta' 220 nm). Il-kolonna xierqa tiġi installata fis-sistema tal-HPLC. L-issettjar tal-HPLC deskritt fil-protokoll ivalidat juża mikron Zorbax SB-C-182, 1 mm × 100 mm × 3.5 bħala l-kolonna ppreferita. Bil-kolonna ta' fażi inversa tal-HPLC, is-sistema shiha għandha tiġi ekwibrata għal 30 °C b'fażi A ta' 50 % (0,1 % (v/v) aċidu trifluworoaċetiku fl-ilma) u fażi B ta' 50 % (0,085 % (v/v) aċidu trifluworoaċetiku fl-aċetonitril) għal tal-inqas sagħtejn qabel ma ssir is-sessjoni. L-analiżi tal-HPLC għandha ssir bl-użu ta' rata tal-fluss ta' 0,35 ml/min u gradjent lineari minn 10 % għal 25 % aċetonitril għal 10 minuti, segwita minn zieda rapida għal 90 % aċetonitril sabiex jitnehhew materjali oħrajn. Għandhom jiġu injettati volumi indaqs ta' kull standard, kampjun u kontroll. Il-kolonna għandha terġa' tiġi ekwibrata għall-kundizzjonijiet inizjali għal 7 minuti bejn l-injezzjonijiet. Jekk tintuża kolonna ta' fażi inversa differenti tal-HPLC, il-parametri tal-issettjar deskritti hawn fuq jista' jkollhom bżonn li jiġu aġġustati sabiex jiggarantixxu elwizzjoni u integrazzjoni xierqa tal-peptidi taċ-ċisteina u l-lizina, inkluz il-volum tal-injezzjoni, li jista' jvarja skont is-sistema uzata (tipikament fil-medda ta' bejn 3-10 µl). Ta' min jgħid li jekk jintuża ssettjar alternattiv tal-HPLC, għandha tintwera l-ekwivalenza tiegħu għall-issettjar ivalidat deskritt hawn fuq (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2). L-assorbiment hija ssorveljata f'220 nm. Jekk jintuża detettur b'serje ta' fotodijodi, għandha tiġi rreġistrata l-assorbiment f'258 nm ukoll. Ta' min jinnota li whud mill-provvisti ta' aċetonitril jista' jkollhom impatt negattiv fuq l-istabilità tal-peptidi u dan irid jiġi vvalutat meta jintuża lott ġdid ta' aċetonitril. Il-proporzjon tal-erja tal-oghla livell ta' 220 u l-erja tal-oghla livell ta' 258 jista' jintuża bħala indikatur ta' koelwizzjoni. Għal kull kampjun, proporzjon fil-medda ta' proporzjon tal-erja < medja ⁽¹⁾ ta' 90 % tal-kampjuni tal-kontroll < 100 % tkun indikazzjoni tajba li ma sehhix koelwizzjoni.

Jista' jkun hemm sustanzi kimiċi tat-test li jistgħu jippromwovu l-ossidazzjoni tal-peptid taċ-ċisteina. L-oghla livell tal-peptid taċ-ċisteina dimerizzat jista' jiġi ssorveljat viżwalment. Jekk jidher li tkun sehhiet dimerizzazzjoni, din għandha titnizzel peress li tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi jista' jkun sopravvalutat u jwassal għal tbsir ta' foloz pozzittivi u/jew assenjament fi klassi ta' reattività oghla (ara l-paragrafi 29 u 30).

L-analiżi tal-HPLC għall-peptidi taċ-ċisteina u l-lizina tista' ssir b'mod parallel (jekk ikun hemm żewġ sistemi tal-HPLC disponibbli(jew f'jiem separati. Jekk l-analiżi ssir f'jiem separati, is-soluzzjonijiet kimiċi kollha tat-test għandhom jithejjew godda għaż-żewġ assaġġi f'kull jum. L-analiżi għandha tiġi ssir f'hin

(¹) Medja tfisser medja aritmetika fid-dokument kollu.

▼ **M7**

allokat sabiex jiġi żgurat li l-injezzjoni tal-ewwel kampjun tibda 22 sa 26 siegħa wara li s-sustanza kimika tat-test thalltet mas-soluzzjoni tal-peptidi. Is-sekwenza tas-sessjoni tal-HPLC għandha tiġi stabbilita sabiex il-hin tal-analizi tal-HPLC jinżamm għal inqas minn 30 siegħa. Għall-issettjar tal-HPLC użat fl-istudju ta' validazzjoni u deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, jistgħu jiġu akkomodati sa 26 kampjun tal-analizi f'sessjoni waħda tal-HPLC (ara l-paragrafu 17 ukoll). Eżempju tat-twettiq tal-analizi tal-HPLC huwa pprovdut fl-Appendiċi 3.

DEJTA U RAPPORTAR**Evalwazzjoni tad-Dejta**

Il-koncentrazzjoni tal-peptid taċ-ċisteina jew il-lizina tiġi stabbilita b'mod fotometriku f'220 nm f'kull kampjun billi titkejjel l-erġa tal-ogħla livell (erġa taht il-kurva, AUC) tal-livelli għoljin xierqa u billi tiġi kkalkolata l-koncentrazzjoni tal-peptid bl-użu tal-kurva ta' kalibrizzjoni lineari derivata mill-istandards.

It-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi huwa stabbilit f'kull kampjun billi titkejjel l-erġa tal-ogħla livell u tiġi diviża bl-erġa tal-ogħla livell medja tal-kontrolli ta' referenza rilevanti C (ara l-Appendiċi 3) skont il-formula deskritta hawn taht.

$$\text{Percent peptide depletion} = \left[1 - \left(\frac{\text{Peptide peak area in replicate injection}}{\text{Mean peptide peak area in reference controls C}} \right) \right] \times 100$$

Kriterji ta' aċċettazzjoni

Sabiex sessjoni titqies valida għandhom jiġu ssodisfati l-kundizzjonijiet li ġejjin:

- il-kurva ta' kalibrizzjoni standard għandu jkollha $r^2 > 0,99$,
- il-valur medju tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi tat-tliet repliki għall-aldeid ċinnamiku tal-kontrolli pożittiv għandu jkun ta' bejn 60,8 % u 100 % għall-peptid taċ-ċisteina u bejn 40,2 % u 69,0 % għall-peptid tal-lizina u d-devjazzjoni standard massima (SD) għar-repliki tal-kontrolli pożittiv għandha tkun ta' < 14,9 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina u < 11,6 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' lizina, u
- il-koncentrazzjoni medja tal-peptidi tal-kontrolli ta' referenza A għandha tkun ta' $0,50 \pm 0,05$ mM u l-koeffiċjent ta' varjazzjoni (CV) tal-erġi tal-ogħla livell tal-peptidi għad-disa' kontrolli ta' referenza B u Ċ fl-aċetonitril għandha tkun ta' < 15,0 %.

Jekk ma jkunx issodisfat wiehed jew iktar minn dawn il-kriterji, is-sessjoni għandha terġa' ssir.

Sabiex ir-riżultati ta' sustanza kimika tat-test jitqiesu validi għandhom jiġu ssodisfati l-kundizzjonijiet li ġejjin:

- id-devjazzjoni standard massima għar-repliki tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun ta' <14,9 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina u <11,6 % għat-tnaqqis fil-perċentwal ta' lizina,
- il-koncentrazzjoni medja tal-peptidi tat-tliet kontrolli ta' referenza C fis-solvent xieraq għandha tkun ta' $0,50 \pm 0,05$ mM. Jekk ma jkunx issodisfati dawn il-kriterji, id-dejta għandha tiġi miċhuda u s-sessjoni għandha terġa' ssir għal dik is-sustanza kimika tat-test speċifika.

Mudell ta' tbassir

Il-valur medju ta' tnaqqis fil-perċentwal ta' lizina u ċisteina jiġi kkalkolat għal kull sustanza kimika tat-test. Tnaqqis negattiv jitqies bħala "0" meta tiġi kkalkolata l-medja. Bl-użu tal-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10/lizina 1:50 muri fit-Tabella 1, il-limitu ta' tnaqqis medju ta' 6,38 % tal-peptidi għandu jintuża sabiex isostni d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-gilda u mhux sensitizzaturi tal-gilda fil-kuntest ta' IATA. L-applikazzjoni tal-mudell ta' tbassir għall-assenjament ta' sustanza kimika tat-test għal klassi ta' reattività (jiġifieri reattività baxxa, moderata u għolja) forsi tista' tkun siewja sabiex tiġi informata l-valutazzjoni tal-potenza fi hdan il-kuntest ta' IATA.

▼ M7

Tabella 1

Mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10/liżina 1:50 ⁽¹⁾

Medja tat-tnaqqis fil-% ta' ċisteina u liżina	Klassi tar-reattività:	Tbassir tad-DPRA ⁽²⁾
$0\% \leq \text{tnaqqis medju } \% \leq 6,38\%$	Ebda reattività jew reattività minima	Negattiv
$6,38\% < \text{tnaqqis medju } \% \leq 22,62\%$	Reattività baxxa	Pożittiv
$22,62\% < \text{tnaqqis medju } \% \leq 42,47\%$	Reattività moderata	
$42,47\% < \text{tnaqqis medju } \% \leq 100\%$	Reattività għolja	

⁽¹⁾ In-numri jirreferu għal valuri limitu ġġenerati statistikament u ma għandhomx x'jaqsmu mal-preċiżjoni tal-kejl.

⁽²⁾ Tbassir tad-DPRA għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 12.

Jista' jkun hemm każijiet li fihom is-sustanza kimika tat-test (is-sustanza jew wiehed jew bosta mill-komponenti ta' sustanza multikostitwenti jew tahlita) tassorbi b'mod sinifikanti f'220 nm u jkollha l-istess hin ta' ritenzjoni bħall-peptid (koelwizzjoni). Il-koelwizzjoni tista' tiġi solvita billi jiġi agġustat bi ftit l-issettjar tal-HPLC sabiex ikompli jiġi separat il-hin tal-elwizzjoni tas-sustanza kimika tat-test u l-peptid. Jekk jintuża ssettjar alternattiv tal-HPLC sabiex tipprova tiġi solvita l-koelwizzjoni, għandha tintwera l-ekwivalenza tiegħu għall-issettjar invvalidat (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2). Meta ssehh koelwizzjoni, l-oġġett tal-peptid ma jistax jiġi integrat u l-kalkolu tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi ma jkunx possibbli. Jekk il-koelwizzjoni tat-tali sustanzi kimiċi tat-test issehh kemm bil-peptidi ta' ċisteina kif ukoll tal-liżina, l-analiżi għandha tiġi rrapportata bħala "inkonkluziva". F'każijiet li fihom il-koelwizzjoni ssehh biss bil-peptid tal-liżina, jista' jintuża l-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10 irrapportat fit-Tabella 2.

Tabella 2

Mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10 ⁽¹⁾

Tnaqqis fil-% ta' ċisteina (Cys) %	Klassi ta' reattività	Tbassir tad-DPRA ⁽²⁾
$0\% \leq \text{tnaqqis } \% \text{ Cys} \leq 13,89\%$	Ebda reattività jew reattività minima	Negattiv
$13,89\% < \text{tnaqqis } \% \text{ Cys} \leq 23,09\%$	Reattività baxxa	Pożittiv
$23,09\% < \text{tnaqqis } \% \text{ Cys} \leq 98,24\%$	Reattività moderata	
$98,24\% < \text{tnaqqis } \% \text{ Cys} \leq 100\%$	Reattività għolja	

⁽¹⁾ In-numri jirreferu għal valuri limitu ġġenerati statistikament u ma għandhomx x'jaqsmu mal-preċiżjoni tal-kejl.

⁽²⁾ Tbassir tad-DPRA għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 12.

Jista' jkun hemm każijiet oħrajn li fihom it-trikkib fil-hin ta' ritenzjoni bejn is-sustanza kimika tat-test u wiehed mill-peptidi jkun inkomplut. F'dawn il-każijiet, il-valuri ta' tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi jista' jiġi stmat u jintuża fil-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10/liżina 1:50, iżda s-sustanza kimika tat-test ma tistax tiġi assenjata għal klassi ta' reattività bi preċiżjoni.

▼ **M7**

Analizi wahda tal-HPLC kemm għall-peptid taċ-ċisteina kif ukoll tal-lizina għandha tkun biżżejjed għal sustanza kimika tat-test meta r-risultat ikun inekwivoku. Madankollu, fi klassijiet ta' risultati li jiġu qrib il-limitu użat sabiex jiddistingwi bejn risultati pożittivi u negattivi (jiġifieri risultati fil-limitu), jaf ikun hemm bżonn li jsiru iktar testijiet. F'sitwazzjonijiet fejn it-tnaqqis fil-perċentwal medju jaqa' fil-medda ta' bejn 3 % sa 10 % għall-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10/lizina 1:50 jew it-tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina jaqa' fil-medda ta' 9 % sa 17 % għall-mudell ta' tbassir ta' ċisteina 1:10, għandha tiġi kkunsidrata t-tieni sessjoni, kif ukoll it-tielet wahda jekk ikun hemm risultati li ma jaqblux bejn l-ewwel żewġ sessjonijiet.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test

— Sustanza monokostitwenti

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritatiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u tahlita:

- Karatterizzazzjoni safejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara iktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara iktar 'il fuq) tal-kostitwenti, safejn ikunu disponibbli;
- Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-piż molekolari jew il-piż molekolari apparenti fil-każ ta' tahlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

Kontrolli

— Kontroll pożittiv

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritatiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;

▼ **M7**

- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;
- Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.
- Solvent/veikolu
 - Is-solvent/il-veikolu użat u l-proporzjon tal-kostitwenti tiegħu, jekk applikabbli;
 - Identifikazzjoni(jiet) kimika, bhall-isem/ismijiet IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, u/jew identifikaturi oħrajn;
 - Il-purità, l-identità kimika tal-impuritàjiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
 - Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżi-kokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintużaw solventi / veikoli oħrajn li mhumiex daww imsemmijin fil-metodu ta' ttestjar u safejn ikunu disponibbli;
 - Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;
 - Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;
 - Għall-aċetonitril, ir-riżultati tat-test tal-impatt fuq l-istabilità tal-peptid.

Preparazzjoni tal-peptidi, il-kontroll pożittiv u s-sustanza kimika tat-test

- Il-karatterizzazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-peptid (il-fornitur, il-lott, il-piż eżatt tal-peptid, il-volum miżjud għas-soluzzjoni ewlenija);
- Karatterizzazzjoni tas-soluzzjoni tal-kontroll pożittiv (il-piż eżatt tas-sustanza tal-kontroll pożittiv, il-volum miżjud għas-soluzzjoni tat-test);
- Karatterizzazzjoni tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test (il-piż eżatt tas-sustanza kimika tat-test, il-volum miżjud għas-soluzzjoni tat-test).

L-issettjar tal-istrument u l-analiżi tal-HPLC

- It-tip ta' strument tal-HPLC, il-kolonni tal-HPLC u l-prekolonni, id-detettur, l-awtokampjunatur;
- Il-parametri rilevanti għall-analiżi tal-HPLC bħat-temperatura tal-kolonna, il-volumi tal-injezzjoni, ir-rata tal-fluss u l-gradjent.

L-idoneità tas-sistema:

- L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika standard u tal-kontroll A ta' referenza;
- Kurva ta' kalibrazzjoni lineari rappreżentata b'mod grafiku u r-r² irrapportata;
- Il-konċentrazzjoni tal-peptid ta' kull replika tal-kontroll A ta' referenza;
- Il-konċentrazzjoni medja tal-peptidi (mM) tat-tliet kontrolli ta' referenza A, SD u CV;
- Il-konċentrazzjoni tal-peptid tal-kontroll ta' referenza A u C.

▼ M7*Sekwenza tal-analiżi*

— Għall-kontrolli ta' referenza:

- L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika B u C;
- L-erja tal-ogħla livell medja tal-peptid f'220 nm tad-disa' kontrolli ta' referenza B u C fl-aċetonitril, SD u CV (għall-istabilità tal-kontrolli ta' referenza tul il-hin tal-analiżi);
- Għal kull solvent użat, l-erja tal-ogħla livell medja tal-peptidi f'220 nm tat-tliet kontrolli ta' referenza xierqa C (għall-kalkolu tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi);
- Għal kull solvent użat, il-konċentrazzjoni ta' peptidi (mM) tat-tliet kontrolli ta' referenza xierqa C;
- Għal kull solvent użat, il-konċentrazzjoni medja ta' peptidi (mM) tat-tliet kontrolli ta' referenza xierqa C, SD u CV.

— Għall-kontrolli pożittivi:

- L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika;
- It-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi ta' kull replika;
- It-tnaqqis medju fil-perċentwal ta' peptidi tat-tliet repliki, SD u CV.

— Għal kull sustanza kimika tat-test:

- Id-dehra tal-preċipitat fit-tahlita tar-rispons fi tmiem il-hin tal-inkubazzjoni, jekk osservat. Jekk il-preċipitat reġa' gie solubilizzat jew gie ċentri-fugat;
- Il-preżenza ta' koelwizzjoni;
- Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti ohra osservata, jekk applikabbli;
- L-erja tal-ogħla livell tal-peptid f'220 nm ta' kull replika;
- It-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi ta' kull replika;
- Il-medja tat-tnaqqis fil-perċentwal ta' peptidi tat-tliet repliki, SD u CV;
- Il-medja tal-valuri ta' tnaqqis fil-perċentwal ta' ċisteina u lizina;
- Il-mudell ta' tbassir użat u t-tbassir tad-DPRA.

Ittestjar tal-profiċjenza

— Jekk applikabbli, il-proċedura użata sabiex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju sabiex iwettaq il-metodu ta' ttestjar (eż. billi jiġu ttestjati s-sustanzi ta' profiċjenza) jew sabiex tintwera prestazzjoni riproduttiva tal-metodu ta' ttestjar matul iż-żmien.

Diskussjoni tar-riżultati

- Diskussjoni tar-riżultati miksubin bil-metodu ta' ttestjar tad-DPRA;
- Diskussjoni tar-riżultati tal-metodu ta' ttestjar fil-kuntest ta' IATA jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti ohra disponibbli.

Konklużjoni

▼ **M7**

TAGHRIF

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) Il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda.
- (4) Il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness: L-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi
- (5) Il-Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi: DA.
- (6) Il-Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi BrdU-ELISA
- (7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.
- (8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.
- (9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.
- (10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Disponibbli fuq: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra>
- (11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.
- (12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.
- (13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.
- (14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.
- (15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.
- (16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.
- (18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Disponibbli fuq: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼ M7

- (19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Disponibbli fuq: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Disponibbli fuq: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138
- (23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Preċiżjoni: Il-qribija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' "rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar (21).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): Sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari għal eżitu ta' interess *in vivo* (2).

Kurva ta' kalibrazzjoni: Ir-relazzjoni bejn il-valur tar-rispons sperimentali u l-koncentrazzjoni analitika (imsejha wkoll *kurva standard*) ta' sustanza magħrufa.

Sustanza Kimika: Sustanza jew tahlita.

Koeffiċjent ta' varjazzjoni: Kejl tal-varjabbiltà li huwa kkalkolat għal grupp ta' dejta dwar ir-replik billi d-devjazzjoni standard tiġi diviża bil-medja. Jista' jiġi mmultiplikat b'100 għall-espressjoni bħala perċentwal.

Periklu: Proprietà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), il-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew grupp ta' sustanzi kimiċi, li tintegra b'mod strutturat u jiżen id-dejta rilevanti kollha sabiex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-htieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Avveniment ta' Inizjazzjoni Molekolari: Perturbazzjoni indotta kimikament ta' sistema bijoloġika fil-livell molekolari identifikata li hija l-avveniment tal-bidu fil-passaġġ tal-eżitu avvers.

Tahlita: Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreagixxux (1).

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

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha iktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikunu preżenti f'koncentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn tahlita u sustanza multikostitwenti hija li tahlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew iktar mingħajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

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

Kontroll ta' referenza: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi

▼ **M7**

stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-preċiżjoni (konkordanza ta' metodu ta' ttestjar) (21).

Affidabilità: Kejl ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettagħ b'mod riproduċibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettagħ billi jintuza l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduċibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibilità fl-istess laboratorju (21).

Riproduċibilità: Il-qbil bejn ir-riżultati miksub mill-ittestjar tal-istess sustanza kimika bl-użu tal-istess protokoll tat-test (ara affidabilità) (21).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (21).

Speċifità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (21).

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (1).

L-idoneità tas-sistema: L-istabbiliment tal-prestazzjoni tal-istrument (eż. is-sensittività) b'analizi ta' standard ta' referenza qabel ma ssir l-analizi tal-lott (22).

Sustanza kimika tat-test: It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuza sabiex jirreferi għal dik li qieghda tiġi ttestjata.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' periklu fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawżjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-haddiema tal-emergenza) u l-ambjent (1).

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

Metodu ta' ttestjar validu: Metodu ta' ttestjar meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabilità għal skop speċifiku u li huwa bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Metodu ta' ttestjar qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (21).

▼ M7

Appendiċi 2

SUSTANZI TA' PROFICIENZA

Sensitizzazzjoni tal-Ġilda *In Chemico*: Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jiksibu b'mod korrett it-tbassir mistenni tad-DPRA għall-10 sustanzi ta' profiċjenza rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksibu valuri ta' tnaqqis taċ-ċisteina u l-lizina li jaqgħu fi hdan il-medda ta' referenza rispettiva għal 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza għal kull peptid. Dawn is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Kriterji tal-għażla oħrajn kienu li jkun disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja u dejta *in vitro* ta' kwalità għolja bid-DPRA għad-dispożizzjoni, u li ntuzaw fl-istudju ta' validazzjoni koordinat mill-ECVAM tal-EURL sabiex tintwera l-implimentazzjoni b'suċċess tal-metodu ta' ttestjar fil-laboratorji li jiehdu sehem fl-istudju.

Tabella 1

Sustanzi ta' profiċjenza rrakkomandati sabiex tintwera l-profiċjenza teknika bl-Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi

Sustanzi ta' Profiċjenza	CASRN	stat fiżiku	Tbassir <i>In Vivo</i> ⁽¹⁾	Tbassir tad-DPRA ⁽²⁾	Medda ⁽³⁾ ta' % tnaqqis tal-peptidi taċ-ċisteina	Medda ⁽³⁾ ta' % tnaqqis tal-peptidi tal-lizina
2,4-Dinitroklorobenzen	97-00-7	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	Pozittiv	90-100	15-45
Ossažolon	15646-46-5	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	Pozittiv	60-80	10-55
Formaldeid	50-00-0	Likwidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	Pozittiv	30-60	0-24
Benziliden-aċeton	122-57-6	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	Pozittiv	80-100	0-7
Farnesal	19317-11-4	Likwidu	Sensitizzatur (dghajjef)	Pozittiv	15-55	0-25
2,3-Butanedjon	431-03-8	Likwidu	Sensitizzatur (dghajjef)	Pozittiv	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5
6-Metilkumarin	92-48-8	Solidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5
Aċidu Lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5
4-Metossiaċetofenon	100-06-1	Solidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	0-7	0-5,5

⁽¹⁾ It-tbassiriet tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* huma bbażati fuq dejta tal-LLNA (19). Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (23).

⁽²⁾ Tbassir tad-DPRA għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 11.

⁽³⁾ Meded stabbiliti fuq il-bażi ta' tal-inqas 10 valuri tat-tnaqqis iġġenerati minn 6 laboratorji indipendenti.

▼ **M7***Appendiċi 3***EŻEMPJI TA' SEKWENZA TAL-ANALIŻI**

L-istandards tal-kalibraġġ u l-kontrolli ta' referenza	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Bafer ta' dilwizzjoni Kontroll ta' referenza A, rep 1 Kontroll ta' referenza A, rep 2 Kontroll ta' referenza A, rep 3
Kontrolli ta' koelwizzjoni	Kontroll ta' koelwizzjoni 1 għas-sustanza kimika tat-test 1 Kontroll ta' koelwizzjoni 2 għas-sustanza kimika tat-test 2
Kontrolli ta' referenza	Kontroll ta' referenza B, rep 1 Kontroll ta' referenza B, rep 2 Kontroll ta' referenza B, rep 3
L-ewwel sett ta' repliki	Kontroll ta' referenza C, rep 1 Aldeid ċinnamiku, rep 1 Kampjun 1, rep 1 Kampjun 2, rep 1
It-tieni sett ta' repliki	Kontroll ta' referenza C, rep 2 Aldeid ċinnamiku, rep 2 Kampjun 1, rep 2 Kampjun 2, rep 2
It-tielet sett ta' repliki	Kontroll ta' referenza C, rep 3 Aldeid ċinnamiku, rep 3 Kampjun 1, rep 3 Kampjun 2, rep 3
Kontrolli ta' referenza	Kontroll ta' referenza B, rep 4 Kontroll ta' referenza B, rep 5 Kontroll ta' referenza B, rep 6

Fis-sekwenza tal-analiżi għandhom ikunu inkluzi tliet settijiet ta' kontrolli ta' referenza (jiġifieri kampjuni kostitwiti biss mill-peptid dissolt fis-solvent xieraq):
 Kontroll ta' referenza A: użat sabiex tiġi vverifikata l-idoneità tas-sistema tal-HPLC.
 Kontroll ta' referenza B: inkluz fil-bidu u fi tmiem is-sekwenza tal-analiżi sabiex tiġi vverifikata l-istabilità tal-kontrolli ta' referenza tul il-hin tal-analiżi.
 Kontroll ta' referenza C: inkluz fis-sekwenza tal-analiżi sabiex jiġi vverifikat li s-solvent użat sabiex tiġi dissolta s-sustanza kimika tat-test ma jhallix impatt fuq il-perċentwal ta' tnaqqis ta' peptidi.

▼ M7

B.60. SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: METODU TA' TTESTJAR TAL-ARE-NRF2 LUCIFERASE**INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 442D tal-OECD (2015). Sensitizzatur tal-ġilda jirreferi għal sustanza li sejra twassal għal reazzjoni allergika wara kuntatt mal-ġilda kif definita mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (1) u r-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP) (1). Dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi proċedura *in vitro* (l-assaġġ tal-ARE-Nrf2 luciferase) li tintuża sabiex tappoġġja d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda skont il-GHS tan-NU (1) u s-CLP.

Hemm qbil ġenerali dwar l-avvenimenti bijoloġiċi ewlenin li jwasslu għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-għarfien eżistenti dwar il-mekkanizmi kimiċi u bijoloġiċi assoċjati mas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ngabar fil-forma ta' Passaġġ tal-Eżitu Avvers (AOP) (2), mill-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari permezz tal-avvenimenti intermedji għall-effett avvers fuq is-sahha, jiġifieri dermatite b'kuntatt allergiku fil-bniedem jew ipersensittività b'kuntatt f'roditori (2) (3). L-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari huwa l-irbit kovalenti ta' sustanzi elettrofilici ma' ċentri nukleofilici fil-proteini tal-ġilda. It-tieni avveniment ewlieni f'dan l-AOP isehh fil-keratinoċiti u jinkludi rispons infjammatorji kif ukoll l-espressjoni tal-ġeni assoċjati mal-passaġġi tas-sinjalar taċ-ċelloli speċifiċi bħall-passaġġi dipendenti fuq l-element ta' rispons tal-elettrofilu/antiossidanti (ARE). It-tielet avveniment ewlieni huwa l-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi, tipikament ivvalutata bl-espressjoni ta' markaturi tal-wieċ taċ-ċelloli, kemikini u ċitokini speċifiċi. Ir-raba' element ewlieni huwa l-proliferazzjoni taċ-ċellola-T, li tiġi vvalutata b'mod indirett fl-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi murin (4).

Normalment, il-valutazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju. Il-metodi klassiċi bbażati fuq fniek tal-indi, it-Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek tal-Indi ta' Magnusson Kligman (GMPT) u t-Test Buehler (TM B.6 (5)), jistudjaw kemm il-fażi tal-induzzjoni kif ukoll il-fażi tal-elicitazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. Test murin, l-Assaġġ Lokali tal-Limfonodi (LLNA, TM B.42 (4)) u ż-żewġ modifiki mhux radjuattivi tiegħu, LLNA: DA (TM B.50 (6)) u LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), li lkoll jivvalutaw ir-rispons tal-induzzjoni b'mod esklussiv, ġew aċċettati wkoll peress li jagħtu vantaġġi fuq it-testijiet fuq il-ħnieżer tal-indi kemm f'termini tat-trattament xieraq tal-annimali kif ukoll tal-kejl oġġettiv tal-fażi tal-induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Iktar riċentement, metodi ta' ttestjar *in chemico* u *in vitro* bbażati mekkanistikament tqiesu xjentifikament validi għall-evalwazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Madankollu, taħlitiet ta' metodi mhux tal-annimali (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) fi hdan Approċċi Integrati għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni (IATA) sejr in ikunu meħtieġa sabiex ikunu sostitwiti bis-shih it-testijiet fuq l-annimali li jintużaw bħalissa fid-dawl tal-kopertura mekkanistika ristretta tal-AOP ta' kull wieħed mill-metodi ta' ttestjar mhux fuq l-annimali li għandna għad-dispożizzjoni bħalissa (2) (3).

Dan il-metodu ta' ttestjar (assaġġ tal-ARE-Nrf2 luciferase) huwa propost sabiex jiġi indirizzat it-tieni avveniment ewlieni kif spjegat fil-paragrafu 2. Is-sensitizzaturi tal-ġilda ġew irrapportati li jinduċu ġeni li huma rregolati mill-element ta' rispons tal-antiossidanti (ARE) (8) (9). Sustanzi elettrofilici żgħar bħal sensitizzaturi tal-ġilda jistgħu jaġixxu fuq il-proteina sensur Keap1 (proteina 1 assoċjata

(1) 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

▼M7

mal-ECH bhall-Kelch), b'perezempju modifika kovalenti tar-residwu taċ-ċisteina tagħha, li tirriżulta fid-dissoċjazzjoni tagħha mill-fattur ta' traskrizzjoni Nrf2 (fattur 2 relatat mal-eritrojde 2 tal-fattur nukleari). Imbagħad l-Nrf2 dissoċjat jista' jattiva ġeni dipendenti fuq l-ARE bħal dawk li jikkodifikaw għal enzimi detossifikanti tal-fażi II (8) (10) (11).

Bhalissa, l-uniku assaġġ *in vitro* ARE-Nrf2 luciferase kopert minn dan il-metodu ta' ttestjar huwa l-assaġġ KeratinoSens™ li għalih saru studji ta' validazzjoni (9) (12) (13) segwiti minn revizjoni bejn il-pari indipendenti li ssir mil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Animali (EURL ECVAM) (14). L-assaġġ KeratinoSens™ tqies li huwa xjentifikament validu sabiex jintuża bħala parti minn IATA għall-appoġġ tad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi tal-ġilda għall-fini ta' klassifikazzjoni u tikkettar tal-periklu (14). Il-laboratorji li lesti li jimplimentaw il-metodu ta' ttestjar jistgħu jiksbu l-linja ta' ċelloli rikombinanti użata fl-assaġġ KeratinoSens™ billi jistabbilixxu qbil fuq il-liċenzji mal-iżviluppatur tal-metodu ta' ttestjar (15).

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI, APPLIKABILITÀ U LIMITAZZJONIJIET

Peress li l-attivazzjoni tal-passaġġ tal-Keap1-Nrf2-ARE tindirizza biss it-tieni avveniment ewleni tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, l-informazzjoni mill-metodi ta' ttestjar fuq il-bażi tal-attivazzjoni ta' dan il-passaġġ aktarx li ma tkunx bizzejjed meta tintuża waħedha sabiex tinhareġ konkluzjoni fuq il-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Għaldaqstant, dejta ġġenerata b'dan il-metodu ta' ttestjar għandha tiġi kkunsidrata fil-kuntest ta' approċċi integrati bħall-IATA, biex b'hekk tiġi kombinata ma' informazzjoni komplimentari oħra, eż. derivata minn assaġġi *in vitro* li jindirizzaw avvenimenti ewlenin oħrajn tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kif ukoll metodi mhux ta' ttestjar inkluż read-across minn analogi kimiċi. Eżempji dwar kif jintuża l-metodu ta' ttestjar ARE-Nrf2 luciferase flimkien ma' informazzjoni oħra huma rrapportati fit-tagħrif (13) (16) (17) (18) (19).

Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża sabiex jappoġġja d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/CLP) u mhux sensitizzaturi fil-kuntest tal-IATA. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jstax jintuża wahdu, lanqas sabiex jiġu sottokategorizzati sensitizzaturi tal-ġilda f'sottokategoriji 1A u 1B kif definiti mill-GHS/CLP tan-NU, u lanqas sabiex titbassar il-potenza għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjoni tas-sikurezza. Madankollu, skont il-qafas regolatorju, riżultat pożittiv jista' jintuża wahdu sabiex sustanza kimika tiġi klassifikata fil-kategorija 1 tal-GHS/CLP tan-NU.

Fuq il-bażi tas-sett ta' dejta mill-istudju ta' validazzjoni u l-ittestjar li jsir internament għar-revizjoni bejn il-pari indipendenti tal-metodu ta' ttestjar, l-assaġġ KeratinoSens™ wera li huwa trasferibbli għal laboratorji esperjenzati fil-kultura taċ-ċelloli. Il-livell ta' riproducibbiltà fil-previzjonijiet li jistgħu jkunu mistennijin mill-metodu ta' ttestjar huwa fl-ordni ta' 85 % fi hdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji (14). Il-preċiżjoni (77 % — 155/201), is-sensittività (78 % — 71/91) u l-ispeċifità (76 % — 84/110) tal-assaġġ KeratinoSens™ għad-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/CLP) u mhux sensitizzaturi meta mqabblin mar-riżultati tal-LLNA ġew ikkalkolati billi giet ikkunsidrata d-dejta kollha li giet sottomessa lill-EURL ECVAM għall-evalwazzjoni u revizjoni bejn il-pari tal-metodu ta' ttestjar (14). Dawn il-figuri huma simili għal dawk li dan l-aħħar ġew ippubblikati dwar l-ittestjar li sar internament ta'

▼ M7

madwar 145 sustanza (77 % preċiżjoni, 79 % sensitività, 72 % speċifiċità) (13). L-assaġġ KeratinoSens™ għandu probabbiltà ikbar li jbassar sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1B tas-CLP/GHS tan-NU) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri sottokategorija 1A tas-CLP/GHS tan-NU) (13) (14). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tal-assaġġ KeratinoSens™ sabiex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-periklu ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Madankollu, il-valuri tal-preċiżjoni mogħtijin hawnhekk għall-assaġġ KeratinoSens™ bhala metodu ta' ttestjar wahdu huma indikattivi biss peress li l-metodu ta' ttestjar għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħrajn ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafu 9 ta' hawn fuq. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li l-LLNA kif ukoll testijiet oħrajn fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni shiha fl-ispeċi ta' interess, jiġifieri fil-bniedem.

It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar sabiex jirreferi għal dak li jkun qiegħed jiġi ttestjat u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tal-metodu ta' ttestjar tal-ARE-Nrf2 luciferase għall-ittestjar ta' sustanzi u/jew tahlitiet. Fuq il-bażi tad-dejta attwali disponibbli, intwera li l-assaġġ KeratinoSens™ huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, mekkaniżmi ta' reazzjoni, potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u proprjetajiet fiżikokimiċi (9) (12) (13) (14). Fil-parti l-kbira ġew ittestjati sustanzi monokostitwenti, għad li jeżisti wkoll ammont limitat ta' dejta fuq l-ittestjar ta' tahlitiet (20). Il-metodu ta' ttestjar xorta wahda huwa teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u tahlitiet. Madankollu, qabel ma jintuza dan il-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiz, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-ghan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita. Barra minn hekk, meta jiġu ttestjati sustanzi multikostitwenti jew tahlitiet, għandha tingħata kunsiderazzjoni lill-interferenza possibbli tal-kostitwenti ċitotossiċi bir-risponsi osservati. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli jew li jiffurmaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojde jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tissedimentax jew tissepura mis-solvent f'fajzjiet differenti) jew fl-ilma jew f'DMSO (inkluzi l-komponenti kollha tas-sustanza kimika tat-test fil-każ ta' ttestjar ta' sustanza multikostitwenti jew tahlita). Is-sustanzi kimiċi li ma jissodisfawx dawn il-kundizzjonijiet fl-ogħla konċentrazzjoni finali meħtieġa ta' 2 000 µM (ara l-paragrafu 22) xorta wahda jistgħu jiġu ttestjati f'konċentrazzjoni inqas. F'dan il-każ, ir-riżultati li jissodisfaw il-kriterji għall-pożittività deskritti fil-paragrafu 39 xorta wahda jistgħu jintużaw sabiex isostnu l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bhala sensitizzatur tal-ġilda, filwaqt li riżultat negattiv iksub b'konċentrazzjonijiet < 1 000 µM għandu jitqies bhala inkonkluziv (ara l-mudell ta' tbassir fil-paragrafu 39). F'sustanzi ġenerali b'LogP sa 5 li ġew ittestjati b'suċċess filwaqt li sustanzi ferm idrofobiċi b'LogP ta' iktar minn 7 jiġu barra l-applikabbiltà magħrufa tal-metodu ta' ttestjar (14). Għal sustanzi b'LogP bejn 5 u 7, hemm biss informazzjoni limitata.

Riżultati negattivi għandhom jiġu interpretati bil-galbu peress li sustanzi b'reattività esklussiva għal residwi tal-lizina jistgħu jiġu individwati bhala negattivi mill-metodu ta' ttestjar. Barra minn hekk, minhabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli uzata (21) u minhabba l-kundizzjonijiet tal-esperiment, proapteni (jiġifieri sustanzi kimiċi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju enzimi P450) u preapteni (jiġifieri sustanzi kimiċi attivati b'awtoossidazzjoni) b'mod partikolari b'rata ta' ossidazzjoni baxxa jistgħu jipprovdu riżultati negattivi wkoll. Min-naħa l-oħra, sustanzi kimiċi tat-test li ma jaġixxux bhala sensitizzatur iżda xorta wahda jkunu stressers kimiċi jistgħu jwasslu għal riżultati foloz pożittivi (14). Barra minn hekk, sustanzi kimiċi tat-test ferm ċitotossiċi dejjem jistgħu jiġu vvalutati b'mod affidabbli. Finalment, sustanzi kimiċi tat-test li jinterferixxu mal-enzima luciferazi jistgħu jhawdu l-attività ta' luciferazi f'assaġġi bbażati fuq iċ-ċelloli li jikkawżaw inibizzjoni apparenti jew luminexxenza ikbar (22). Pereżempju, konċentrazzjonijiet ta' fitoestrogen ikbar minn 1 µM ġew irrapportati li jinterferixxu mas-sinjali ta' luminexxenza f'assaġġi oħrajn tal-gene indikatur ibbażati fuq luciferazi minhabba sovrativazzjoni tal-gene indikatur ta' luciferazi (23).

▼ M7

Bħala konsegwenza, l-espressjoni ta' luciferażi miksuba f'konċentrazzjonijiet għoljin ta' fitoestrogeni jew sustanzi kimiċi simili ssuspettati li jipproduċu sovrattivazzjoni bħall-fitoestrogen tal-gene indikatur ta' luciferażi jridu jiġu eżaminati bir-reqqa (23). F'każijiet li fihom tista' tiġi pprovduta evidenza fuq in-nuqqas ta' applikabilità tal-metodu ta' ttestjar għal kategoriji speċifiċi ta' sustanzi kimiċi tat-test, il-metodu ta' ttestjar ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

Minbarra li jgħin fid-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda u mhux sensitizzaturi, l-assaġġ KeratinoSens™ jipprovdi wkoll informazzjoni dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA (19). Madankollu, hemm bżonn li jsir iktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' dejta affidabbli mill-bniedem, sabiex jiġi stabbilit kif ir-risultati tal-assaġġ KeratinoSens™ jistgħu jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza (24) u għas-sotto-kategorizzazzjoni tas-sensitizzaturi skont il-GHS tan-NU/CLP.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-ARE-Nrf2 luciferase jagħmel użu minn linja ta' ċelloli aderenti immortalizzata miksuba minn keratinoċiti umani HaCaT transfessi b'mod stabbli bi plazmid selezzjonabbli. Il-linja ta' ċelloli li fiha l-gene luciferażi taht il-kontroll transkrizzjonali ta' promotur kostituttiv fuż ma' element ARE minn gene li huwa magħruf li jiġi soprarregolat minn sensitizzaturi ta' kuntatt (25) (26). Is-sinjal ta' luciferażi jirrifletti l-attivazzjoni minn sensitizzaturi ta' geni dipendenti Nrf2 endoġeni, u ntweriet id-dipendenza tas-sinjal ta' luciferażi fil-linja ta' ċelloli rikombinanti fuq Nrf2 (27). Dan jippermetti li jsir kejl kwantitattiv (b'detezzjoni tal-luminexxenza) tal-induzzjoni tal-gene ta' luciferażi, bl-użu ta' sottostrati ta' luciferażi li jipproduċu d-dawl ferm stabbiliti, bħala indikatur tal-attività tal-fattur ta' traskrizzjoni ta' Nrf2 f'ċelloli wara l-esponiment għal sustanzi elettrofiliċi.

Is-sustanzi kimiċi tat-test jitqiesu pożittivi fl-assaġġ KeratinoSens™ jekk jinduċu induzzjoni statistikament sinifikanti tal-attività ta' luciferażi f'livell oghla minn limitu partikolari (jiġifieri > zieda b'darba u nofs jew 50 %), taht konċentrazzjoni definita li ma taffettwax b'mod sinifikanti l-vijabbiltà (jiġifieri inqas minn 1 000 µM u f'konċentrazzjoni li fiha l-vijabbiltà ċellolari tkun oghla minn 70 % (9) (12)). Għal dan il-ghan, tiġi stabbilita l-induzzjoni tad-drabi massimali tal-attività ta' luciferażi fuq il-kontroll tas-solvent (negattiv) (I_{max}). Barra minn hekk, peress li ċ-ċelloli huma esposti għal sensiela ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test, il-konċentrazzjoni mehtieġa għal induzzjoni statistikament sinifikanti ta' attività ta' luciferażi oghla mil-limitu (jiġifieri valur tal- $EC_{1.5}$) għandha tiġi interpolata mill-kurva ta' doża — rispons (ara l-paragrafu 32 għall-kalkoli). Finalment, għandhom isiru kejljet taċ-ċitotossicità paralleli sabiex jiġi vvalutat jekk il-livelli ta' induzzjoni tal-attività ta' luciferażi jsehhux f'konċentrazzjonijiet sottoċitotossici.

Qabel l-użu ta' rutina tal-assaġġ tal-ARE-Nrf2 luciferase li jaderixxi għal dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-għaxar Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 2.

Standards tal-prestazzjoni (PS) (28) huma disponibbli sabiex tiġi ffaċilitata l-validazzjoni ta' metodi ta' ttestjar *in vitro* tal-ARE-Nrf2 luciferase simili għall-assaġġ KeratinoSens™ u jippermettu għall-emendar fil-hin ta' dan il-metodi ta' ttestjar għall-inkluzjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Dejta (MAD) skont il-ftehim tal-OECD sejjer ikun garantit biss għal metodi ta' ttestjar ivvalidati skont il-PS, jekk dawn il-metodi ta' ttestjar ġew riveduti u inkluzi fil-linja gwida ta' ttestjar korrispondenti mill-OECD.

▼ **M7****PROCEDURA**

Bhalissa, l-uniku metodu kopert minn dan il-metodu ta' ttestjar huwa l-assaġġ xjentifikament validu KeratinoSensTM (9) (12) (13) (14). Il-Proċeduri Operazzjonali Standard (SOP) għall-assaġġ KeratinoSensTM huma disponibbli u għandhom jithaddmu meta jiġi implimentat u jintuża l-metodu ta' ttestjar fil-laboratorju (15). Il-laboratorji li lesti li jimplimentaw il-metodu ta' ttestjar jistgħu jiksibu l-linja ta' ċelloli rikombinanti uzata fl-assaġġ KeratinoSensTM billi jistabbilixxu qbil fuq il-liċenzji mal-iżviluppatur tal-metodu ta' ttestjar (15). Il-paragrafi li ġejjin jipprovdu deskrizzjoni tal-komponenti u l-proċeduri ewlenin ta' ttestjar tal-metodu ta' ttestjar tal-ARE-Nrf2 luciferase.

Preparazzjoni tal-kulturi tal-keratinoċiti

Għandha tintuża linja ta' ċelloli transgenika b'inserzjoni stabbli tal-gene indikatur ta' luciferazi taħt il-kontroll tal-element ARE (eż. linja ta' ċelloli tal-KeratinoSensTM). Malli jiġu riċevuti, iċ-ċelloli jiġu propagati (eż. 2 sa 4 passigġieri) u jinħażnu ffrizati bħala stokk omoġenu. Ċelloli minn dan l-istokk oriġinali jistgħu jiġu propagati sa numru massimu ta' passigġieri (jiġifieri 25 fil-każ ta' KeratinoSensTM) u jithaddmu għall-ittestjar ta' rutina bl-użu tal-medium ta' manutenzjoni xieraq (fil-każ ta' KeratinoSensTM dan jirrappreżenta DMEM b'serum u Genetecina).

Għall-ittestjar, iċ-ċelloli għandhom ikunu 80-90 % konfluwenti, u wiehed għandu joqgħod attent li jiżgura li iċ-ċelloli qatt ma jikbru għal konfluwenza shiha. Jum wiehed qabel ma jiġu ttestjati, iċ-ċelloli jinġabru u jiġu distribwiti f' pjastrji b'96 bwejra (10 000 ċellola/bwejra fil-każ ta' KeratinoSensTM). Għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata sedimenazzjoni taċ-ċelloli matul it-tiżriġ sabiex tiġi żgurata distribuzzjoni ta' numru omoġenu ta' ċelloli bejn il-bwejriet. Jekk dan mhuwiex il-każ, dan l-istadju jista' jwassal għal varjabbiltà kbira bejn bwejra u oħra. Għal kull ripetizzjoni, jintużaw tliet repliki għall-kejl tal-attività ta' luciferazi, u replika parallela waħda uzata għall-assaġġ tal-vijabbiltà taċ-ċelloli.

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

Is-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jithejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-assaġġ KeratinoSensTM, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti fis-sulfossidu tad-dimetil (DMSO) għall-konċentrazzjoni finali mixtieqa (eż. 200 mM). Is-soluzzjonijiet tad-DMSO jistgħu jitqiesu awtosterelizzanti, u b'hekk ma hemm bżonn ta' ebda filtrazzjoni sterili. Is-sustanza kimika tat-test mhux solubbli fid-DMSO tiġi dissolta filma sterili jew medium tal-kultura sterili, u s-soluzzjonijiet sterelizzati b'perezempju filtrazzjoni. Għal sustanza kimika tat-test li ma għandha ebda piż molekolari definit (MW), tithejja soluzzjoni ewlenija għal konċentrazzjoni prestabbilita (40 mg/mL jew 4 % (w/v)) fl-assaġġ KeratinoSensTM. F'każ li jintużaw solventi oħrajn li mhuwiex DMSO, ilma jew il-medium tal-kultura, għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika suffiċjenti.

Fuq il-bażi tas-soluzzjonijiet ewlenin DMSO tas-sustanza kimika tat-test, isiru dilwizzjonijiet serjali bl-użu tad-DMSO sabiex jinkisbu 12-il konċentrazzjoni ewlenija tas-sustanza kimika li sejra tiġi ttestjata (minn 0.098 sa 200 mM fl-assaġġ KeratinoSensTM assay). Għal sustanza kimika tat-test mhux solubbli fid-DMSO, id-dilwizzjonijiet sabiex jinkisbu l-konċentrazzjonijiet ewlenin isiru bl-użu ta' ilma sterili jew medium tal-kultura sterili. Independentement mis-solvent użat, il-konċentrazzjonijiet ewlenin, imbagħad jiġu dilwiti għal 25 darba fil-medium tal-kultura li fih is-serum, u finalment jintużaw għat-trattament b'fattur ta' dilwizzjoni 4 darbiet oħra sabiex il-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanza kimika ttestjata jvarjaw minn 0.98 sa 2 000 µM fl-assaġġ KeratinoSensTM. Jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet oħrajn jekk tiġi pprovduta ġustifikazzjoni (eż. fil-każ ta' ċitotossicità jew solubilità baxxa).

Il-kontroll negattiv (solvent) użat fl-assaġġ KeratinoSensTM huwa DMSO (Nru CAS 67-68-5, ≥ purità ta' 99 %), li għalih jithejjew sitt bwejriet għal kull pjastra. Jgħaddi mill-istess dilwizzjoni kif deskritta għall-konċentrazzjonijiet ewlenin fil-paragrafu 22, sabiex il-konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv (solvent) finali tkun

▼M7

1 %, maghrufa li ma taffettwax il-vijabbiltà tač-ċelloli u tikkorrispondi għall-istess konċentrazzjoni tad-DMSO li tinstab fis-sustanza kimika ttestjata u fil-kontroll pożittiv. Għal sustanza kimika tat-test mhux solubbli fid-DMSO, li għaliha d-dilwizzjonijiet saru fl-ilma, il-livell tad-DMSO fil-bwejriet kollha tas-soluzzjoni finali tat-test irid jiġi aġġustat għal 1 % bħal għas-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll l-oħrajn.

Il-kontroll pożittiv użat fl-assaġġ KeratinoSens™ huwa aldeid ċinnamiku (Nru CAS 14371-10-9, $\geq$ purità ta' 98 %), li għalih tithejja sensiela ta' 5 konċentrazzjoni ewlenin li jvarjaw minn 0.4 sa 6.4 mM fid-DMSO (minn soluzzjoni ewlenija ta' 6.4 mM) u dilwiti kif deskritt għall-konċentrazzjonijiet ewlenin fil-paragrafu 22, sabiex il-konċentrazzjoni finali tal-kontroll pożittiv tvarja minn 4 sa 64 μ M. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħrajn, idealment li jipprovdu valuri fil-medda medja tal-EC_{1.5}, jekk ikun hemm dejta storika disponibbli sabiex jinkisbu kriterji ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni paragonabbli.

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

Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll pożittiv, huwa meħtieġ esperiment wiehed sabiex jinkiseb tbassir (pożittiv jew negattiv), li jikkonsisti f'tal-inqas żewġ ripetizzjonijiet indipendenti li kull wiehed ikun fih tliet repliki (jiġifieri n=6). Fil-każ ta' riżultati li ma jaqblux bejn iż-żewġ ripetizzjonijiet indipendenti, għandha ssir it-tielet ripetizzjoni li fiha tliet repliki (jiġifieri n=9). Kull ripetizzjoni indipendenti ssir f'għurnata differenti b'soluzzjoni ewlenija ġdida tas-sustanzi kimiċi tat-test u ċelloli migburin indipendentement. Madankollu, iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ.

Wara t-tizriġ deskritt fil-paragrafu 20, iċ-ċelloli jitkabbru għal 24 siegħa fil-pjastru għall-mikrotitraġġ b'96 bwejra. Imbagħad il-medium jitneħħa u jiġi sostitwit ma' medium tal-kultura ġdid (medium tal-kultura ta' 150 μ l li fih serum iżda mingħajr Ġenetčina fil-każ ta' KeratinoSens™) li miegħu jiżdiedu 50 μ l tas-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll dilwiti 25 darba. Tal-inqas bwejra wahda għal kull pjastra għandha tithalla vojta (ebda ċellola u ebda trattament) sabiex jiġu vvalutati l-valuri ta' sfond.

Il-pjastru ttrattati imbagħad jiġu inkubati għal madwar 48 siegħa f'37 $\pm$ 1 °C fil-preżenza ta' 5 % CO₂ fl-assaġġ KeratinoSens™. Għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni inkroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastru jitgħattew bil-fojl qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test.

Kejliet tal-attività ta' luċiferażi

Tliet fatturi huma kritiċi sabiex jiġi żgurat qari tajjeb tal-valuri tal-luminexxenza:

- l-għażla ta' luminometru sensittiv,
- l-użu ta' format ta' pjastra għolja biżżejjed sabiex tevita kontaminazzjoni kroċjata hafifa; u
- l-użu ta' sottostrat ta' luċiferażi b'biżżejjed output ta' dawl sabiex jiġu żgurati sensittività suffiċjenti u varjabbiltà baxxa.

Qabel l-ittestjar, għandu jsir issettjar tal-esperiment tal-kontroll kif deskritt fl-Appendiċi 3 sabiex jiġi żgurat li jkunu ssodisfati dawn it-tliet punti.

Wara l-hin tal-esponiment ta' 48 siegħa bis-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll fl-assaġġ KeratinoSens™, iċ-ċelloli jinhaslu b'salina bbaferjata bil-fosfat, u l-bafer tal-lizi rilevanti għall-qari tal-valuri tal-luminexxenza jiżdied f'kull bwejra għal 20 min f'temperatura ambjentali.

▼ **M7**

Il-pjastru bil-lizat taċ-ċelloli mbaġħad jitqiegħdu fil-luminometri għall-qari ta' liema fl-assaġġ KeratinoSens™ hija programmata sabiex: (i) iżżid is-sottostrat ta' luċiferażi f'kull bwejra (jiġifieri 50 µl), (ii) tistenna sekonda, u (iii) tintegra l-attività ta' luċiferażi għal 2 sekondi. F'każ li jintuża ssettjar differenti, eż. skont il-mudell tal-luminometru użat, dan għandu jkun iġġustifikat. Barra minn hekk, jista' jintuża wkoll sottostrat li jiddi diment li jkun ta' suċċess l-esperiment tal-kontroll tal-kwalità tal-Appendiċi 3.

Valutazzjoni taċ-Ċitotossicità

Għall-assaġġ tal-vijabbiltà taċ-ċelloli KeratinoSens™, il-medium jiġi sostitwit wara l-hin tal-esponiment ta' 48 siegħa b'medium ġdid li fih MTT (3-(4,5-Dimetiltetrazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolu bromur, Tjażolil blu tetrazolu bromur; Nru CAS 298-93-1) u ċ-ċelloli inkubati għal 4 sigħat f'37 °C fil-preżenza ta' 5 % CO₂. Imbaġħad jitneħħa l-medium tal-MTT u ċ-ċelloli jiġu lizzati (eż. billi tiżdied soluzzjoni SDS ta' 10 % f'kull bwejra) mal-lejl. Wara t-thawwid, jitkejjel l-assorbiment f'600 nm b'fotometru.

DEJTA U RAPPORTAR**Evalwazzjoni tad-Dejta**

Il-parametri li ġejjin huma kkalkolati fl-assaġġ KeratinoSens™:

- l-induzzjoni medja massimali tad-drabi tal-valur ta' attività ta' luċiferażi ($I_{\max}$) osservat fi kwalunkwe konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u l-kontroll pożittiv;
- inkiseb il-valur tal-EC_{1.5} li jirrappreżenta l-konċentrazzjoni li għaliha l-induzzjoni tal-attività ta' luċiferażi tkun oġġla mil-limitu ta' darba u nofs (jiġifieri attività ta' luċiferażi msahħa ta' 50 %); u
- il-valuri tal-konċentrazzjoni tal-IC₅₀ u IC₃₀ għal tnaqqis ta' 50 % u 30 % tal-vijabbiltà ċellolari.
- L-induzzjoni tad-drabi tal-attività ta' luċiferażi tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 1, u l-induzzjoni tad-drabi massimali kumplessiva ($I_{\max}$) tiġi kkalkolata bħala l-medja tar-ripetizzjonijiet individwali.

Ekwazzjoni 1:

$$\text{Fold induction} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

fejn

L_{kampjun} hija l-valur ta' luminexxenza fil-bwejra tas-sustanza kimika tat-test

L_{inbjank} hija l-valur ta' luminexxenza fil-bwejra inbjank li ma fiha ebda ċellola u ebda trattament

L_{solvent} hija l-valur medju tal-luminexxenza fil-bwejriet li fihom ċelloli u kontroll tas-solvent (negattiv)

EC_{1.5} tiġi kkalkolata bl-interpolazzjoni lineari skont l-Ekwazzjoni 2, u l-EC_{1.5} kumplessiva tiġi kkalkolata bħala l-medja ġeometrika tar-ripetizzjonijiet individwali.

Ekwazzjoni 2:

$$EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1.5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

▼ **M7**

fejn

C_a hija l-inqas konċentrazzjoni f μ M b'induzzjoni ta' > darba u nofs

C_b hija l-ogħla konċentrazzjoni f μ M b'induzzjoni ta' < darba u nofs

I_a hija l-induzzjoni tad-drabi mkejla fl-inqas konċentrazzjoni b'induzzjoni ta' > darba u nofs (medja ta' tliet bwejrjet ta' replika)

I_b hija l-induzzjoni tad-drabi mkejla fl-ogħla konċentrazzjoni b'induzzjoni ta' < darba u nofs (medja ta' tliet bwejrjet ta' replika) Il-vijabbiltà hija kkalkolata bl-Ekwazzjoni 3:

Ekwazzjoni 3:

$$Viability = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

fejn

$V_{kampusun}$ hija l-valur tal-assorbiment tal-MTT fil-bwejra tas-sustanza kimika tat-test

$V_{inbjank}$ hija l-valur tal-assorbiment tal-MTT fil-bwejra inbjank li ma fiha ebda ċellola u ebda trattament

$V_{solvent}$ hija l-valur medju l-valur tal-assorbiment tal-MTT fil-bwejrjet li fihom ċelloli u kontroll tas-solvent (negattiv)

IC_{50} u IC_{30} jiġu kkalkolati bl-interpolazzjoni lineari skont l-Ekwazzjoni 4, u l- IC_{50} u IC_{30} kumplessivi jiġu kkalkolati bħala l-medja geometrika tar-ripetizzjonijiet individwali.

Ekwazzjoni 4:

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

fejn

X huwa t-naqqis % fil-konċentrazzjoni li jrid jiġi kkalkolat (50 u 30 għal IC_{50} u IC_{30})

C_a hija l-inqas konċentrazzjoni f μ M bi tnaqqis ta' > x % fil-vijabbiltà

C_b hija l-ogħla konċentrazzjoni f μ M bi tnaqqis ta' < x % fil-vijabbiltà

V_a hija l-vijabbiltà % fl-inqas konċentrazzjoni bi tnaqqis ta' > x % fil-vijabbiltà

V_b hija l-vijabbiltà % fl-ogħla konċentrazzjoni bi tnaqqis ta' < x % fil-vijabbiltà

Għal kull konċentrazzjoni li turi induzzjoni tal-attività ta' luċiferazi ta' > darba u nofs, tiġi kkalkolata s-sinifikanza statistika (eż. b'test-t ta' Student b'żewġ idnieb), billi jitqabblu l-valuri tal-luminexxenza għat-tliet kampjuni repliki mal-valuri tal-luminexxenza fil-bwejrjet tal-kontroll tas-solvent (negattiv) sabiex jiġi stabbilit jekk l-induzzjoni tal-attività ta' luċiferazi hijiex statistikament sinifikanti ($p < 0.05$). L-inqas konċentrazzjoni b'induzzjoni tal-attività ta' luċiferazi ta' > darba u nofs hija l-valur li jstabbilixxi l-valur tal- $EC_{1.5}$. Huwa vverifikat f'kull każ jekk dan il-valur huwiex inqas mill-valur tal- IC_{30} , xi haġa li tindika li hemm inqas minn tnaqqis ta' 30 % fil-vijabbiltà ċellolari fil-konċentrazzjoni li tiddetermina l- $EC_{1.5}$.

▼ **M7**

Huwa rakkomandat li d-dejta tiġi vverifikata b'mod viżwali bl-ghajnuna ta' graf-fijiet. Jekk ma tiġi osservata ebda kurva ċara ta' doża — rispons, jew jekk il-kurva ta' doża — rispons miksuba tkun bifazika (jiġifieri taqbeż il-limitu ta' 1.5 darbtejn), l-esperiment għandu jerga' jsir sabiex jiġi verifikat jekk din hijiex speċifika għas-sustanza kimika tat-test jew hijiex dovuta għal artefatt tal-esperiment. F'każ li r-rispons bifaziku jkun riproducibbli f'esperiment indipendenti, għandu jiġi rrapportat il-valur inferjuri tal-EC_{1.5} (il-konċentrazzjoni meta l-limitu ta' 1.5 jinqabeż għall-ewwel darba).

Fil-każijiet rari li fihom tiġi osservata induzzjoni mhux statistikament sinifikanti oghla minn darba u nofs segwita minn konċentrazzjoni oghla b'induzzjoni statistikament sinifikanti, ir-riżultati minn din ir-ripetizzjoni jitqiesu bħala validi u pożittivi biss jekk l-induzzjoni statistikament sinifikanti oghla mil-limitu ta' 1.5 inkisbet għal konċentrazzjoni mhux ċitotossika.

Finalment, għal sustanzi tat-test li jiġġeneraw induzzjoni ta' darba u nofs jew ikbar diġà fl-inqas konċentrazzjoni tat-test ta' 0.98 µM, jiġi stabbilit il-valur tal-EC_{1.5} ta' <0.98 fuq il-bażi ta' spezzjoni viżwali tal-kurva ta' doża — rispons.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuza l-assaġġ KeratinoSensTM. L-ewwel nett, l-induzzjoni tal-attività ta' luċiferażi miksuba bil-kontroll pożittiv, l-aldeid ċinnamiku, għandha tkun statistikament sinifikanti oghla mil-livell ta' 1.5 (eż. bl-użu ta' test-T) f'tal-inqas wahda mill-konċentrazzjonijiet ittestjati (minn 4 sa 64 µM).

It-tieni, il-valur tal-EC_{1.5} għandu jkun fi hdan żewġ devjazzjonijiet standard tal-medja storika tal-faċilità ta' ttestar (eż. bejn 7 µM u 30 µM fuq il-bażi tas-sett ta' dejta ta' validazzjoni) li għandha tiġi aġġornata b'mod regolari. Barra minn hekk, l-induzzjoni medja fit-tliet repliki għall-aldeid ċinnamiku f'64 µM għandha tkun ta' bejn 2 u 8. Jekk ma jkunx issodisfat dan l-aħhar kriterju, ir-rispons għad-doża tal-aldeid ċinnamiku għandu jiġi vverifikat bil-galbu, u t-testijiet jisgħu jiġu aċċettati biss jekk ikun hemm rispons għad-doża ċar b'induzzjoni tal-attività ta' luċiferażi li tiżdied meta jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet għall-kontroll pożittiv.

Fl-aħhar nett, il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni tal-qari tal-valur tal-luminex-xenza għad-DMSO tal-kontroll negattiv (solvent) għandu jkun inqas minn 20 % f'kull ripetizzjoni li tikkonsisti f'6 bwejrjet ittestjati fi triplikati. Jekk il-varjabbiltà tkun oghla, ir-riżultati għandhom jiġu injorati.

Interpretazzjoni tar-riżultati u l-mudell ta' tbassir

Tbassir ta' KeratinoSensTM jitqies pożittiv jekk ikunu ssodisfati l-4 kundizzjonijiet li ġejjin fi 2 minn 2 jew fl-istess 2 minn 3 ripetizzjonijiet, inkella t-tbassir ta' KeratinoSensTM jitqies negattiv (Figura 1):

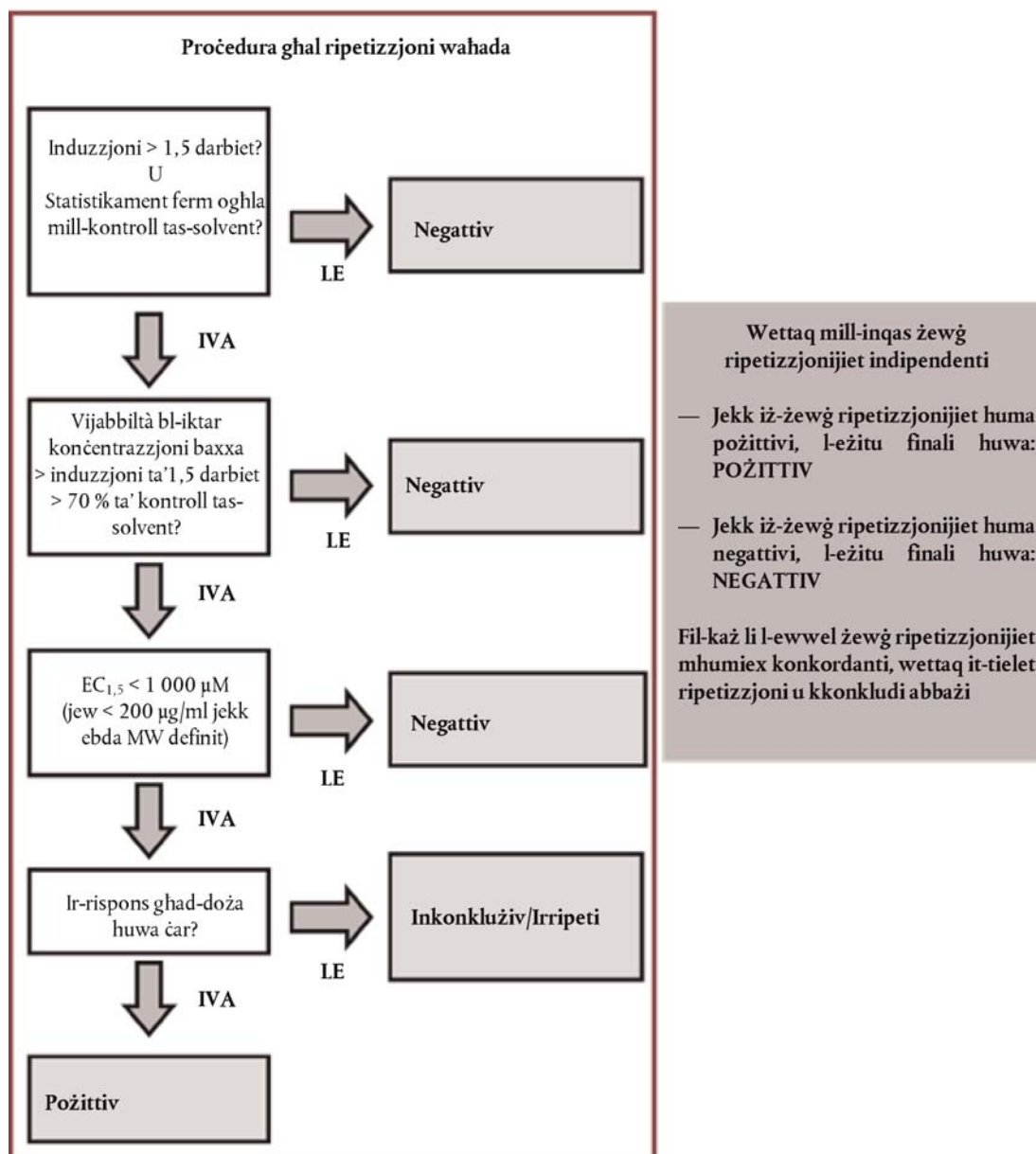
1. I_{max} hija oghla (>) minn darba u nofs u statistikament differenti b'mod sinifikanti meta mqabbla mal-kontroll tas-solvent (negattiv) (kif stabbilit mit-test-T Student diżakkoppjat b'żewġ idnieb);
2. il-vijabbiltà ċellolari hija oghla minn (>) 70 % fl-inqas konċentrazzjoni bl-induzzjoni ta' attività ta' luċiferażi ikbar minn darba u nofs (jiġifieri fil-konċentrazzjoni li tiddetermina l-EC_{1.5});
3. il-valur tal-EC_{1.5} huwa inqas minn (<) 1 000 µM (jew < 200 µg/ml għal sustanzi kimiċi tat-test mingħajr MW definit);
4. hemm rispons għad-doża apparenti kumplessiv għall-induzzjoni ta' luċiferażi (jew rispons bifaziku kif imsemmi fil-paragrafu 33).

▼ **M7**

Jekk f'ripetizzjoni partikolari, jiġu ssodisfati l-ewwel tliet kundizzjonijiet iżda ma jistax jiġi osservat rispons ċar għad-doża għall-induzzjoni ta' luċiferażi, ir-risultat ta' dik ir-ripetizzjoni għandu jitqies bħala inkonklużiv u jista' jkun hemm bżonn ta' iktar ittestjar (Figura 1). Barra minn hekk, riżultat negattiv miksub b'konċentrazzjonijiet < 1 000 µM (jew < 200 g/ml għal sustanzi kimiċi tat-test mingħajr MW definit) għandu jiġi kkunsidrat bħala inkonklużiv ukoll (ara l-paragrafu 11).

Figura 1

Il-mudell ta' tbassir użat fl-assaġġ KeratinoSens™. Tassir tal-assaġġ KeratinoSens™ għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 11.



F'każijiet rari, is-sustanzi kimiċi tat-test li jinduċu l-attività ta' luċiferażi ferm qrib il-livelli ta' tossiċità jistgħu jkunu pożittivi f'ċerti ripetizzjonijiet f'livelli mhux ċitotossiċi (jiġifieri konċentrazzjoni li tistabbilixxi l-EC_{1,5} inqas (<) mill-IC₃₀), u f'ripetizzjonijiet oħrajn f'livelli tossiċi biss (jiġifieri konċentrazzjoni li tiddetermina l-EC_{1,5} ikbar (>) mill-IC₃₀). Dawn is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jergħu jiġu ttestjati b'analizi tar-rispons għad-doża iktar ristretta bl-użu ta' fattur

▼M7

ta' dilwizzjoni inferjuri (eż. dilwizzjoni għal 1,33 jew Öid-doppju (= 1,41) bejn il-bwejrjet), sabiex jiġi stabbilit jekk seħhitx induzzjoni f'livelli ċitotossiċi jew le (9).

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test

— Sustanza monokostitwenti

- Identifikazzjoni kimika, bhall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, is-solubilità fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritàjiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-hżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

— Sustanza multikostitwenti, UVCB u tahlita:

- Karatterizzazzjoni safejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara iktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara iktar 'il fuq) tal-kostitwenti, safejn ikunu disponibbli;
- Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, is-solubilità fid-DMSO u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' tahlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-hżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli.

Kontrolli

— Kontroll pożittiv

- Identifikazzjoni kimika, bhall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, is-solubilità fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritàjiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-hżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;

▼ **M7**

- Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.
- Kontroll negattiv (veikolu)
 - Identifikazzjoni kimika, bhall-isem/ismijiet IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, u/jew identifikaturi oħrajn;
 - Il-purità, l-identità kimika tal-impuritàjiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
 - Id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, il-piż molekolari, u proprjetajiet fiżi-kokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintużaw kontrolli negattivi / veikoli oħrajn li mhumiex daww imsemmijin f'dan il-metodu ta' ttestjar u safejn ikunu disponibbli;
 - Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabilità, safejn ikunu disponibbli;
 - Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-Kundizzjonijiet tal-Metodu ta' Ttestjar

- L-isem u l-indirizz tal-isponser, tal-facilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;
- Deskrizzjoni tal-metodu ta' ttestjar użat;
- Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-facilità mnejn inkisbet);
- In-numru tal-passaġġ u l-livell ta' konfluwenza ta' ċelloli użati għall-ittestjar;
- Il-metodu ta' għadd taċ-ċelloli għat-tizriġ qabel l-ittestjar u l-mizuri meħudin sabiex tiġi żgurata distribuzzjoni omoġena tan-numru ta' ċelloli (ara l-paragrafu 20);
- Il-luminometru użat (eż. il-mudell), inkluż l-issettjar tal-istrument, is-sottostrat ta' luċiferazi użat, u wiri tal-kejl ta' luminexxenza xierqa fuq il-bażi tat-test tal-kontroll deskritt fl-Appendiċi 3;
- Il-proċedura użata sabiex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju sabiex iwettaq il-metodu ta' ttestjar (eż. billi jiġu ttestjati s-sustanzi ta' profiċjenza) jew sabiex tintwera prestazzjoni riproducibbli tal-metodu ta' ttestjar matul iż-żmien.

Proċedura tat-test

- In-numru ta' ripetizzjonijiet u repliki użati;
- Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, il-proċedura ta' applikazzjoni u l-ħin tal-esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat)
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

- It-tqeghid f'tabella tal-valuri tal- I_{max} , $EC_{1.5}$ u tal-vijabbiltà (jiġifieri IC_{50} , IC_{30}) miksubin għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontroll pożittiv għal kull ripetizzjoni kif ukoll il-valuri medji (I_{max} : medja; $EC_{1.5}$ u l-valuri tal-vijabbiltà: medja geometrika) u SD ikkalkolata bl-użu ta' dejta mir-ripetizzjonijiet individwali kollha u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell ta' tbassir;

▼ **M7**

- Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni miksub bil-qari tal-valuri tal-luminexxenza għall-kontroll negattiv għal kull esperiment;
- Graff li turi l-kurvi ta' doża — rispons għall-induzzjoni tal-attività ta' luċiferazi u l-vijabbiltà;
- Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti ohra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

- Diskussjoni tar-riżultati miksubin bil-metodu ta' ttestjar tal-assaġġ Keratino-Sens_{TM};
- Kunsiderazzjoni tar-riżultati tal-metodu ta' ttestjar fil-kuntest ta' IATA jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti ohra disponibbli.

Konkluzjoni

TAGHRIF

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.
- (3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.
- (4) Il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi.
- (5) Il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda.
- (6) Il-Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi. DA.
- (7) Il-Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-ġilda: Assaġġ Lokali tal-Limfonodi. BrdU-ELISA.
- (8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.
- (9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.
- (10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

- (11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1), 45-49.
- (12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33, 1337-1352.
- (14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- (15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 pp. Available: <http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>
- (16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- (17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- (18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.
- (19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
- (20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
- (21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1699.
- (22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- (23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.*, 126, 1813-1822.

▼ **M7**

- (26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
- (27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. in vitro* 27, 2225-2232.
- (28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.
- (29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.
- (30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. <http://www.epa.gov/opp-fead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Preċiżjoni: Il-qribija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' "rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar (29).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): Sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekolari għal eżitu ta' interess *in vivo* (2).

ARE: Element tar-rispons tal-antiossidanti (imsejjah ukoll EpRE, element tar-rispons tal-elettrofili), huwa element ta' rispons li jinsab fir-reġjun tal-promotur upstream ta' hafna ġeni ċitoprotettivi u tal-fażi II. Meta jiġi attiv minn Nrf2, iservi ta' medjatur għall-induzzjoni transkrizzjonali ta' dawn il-ġeni.

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita.

Koeffiċjent ta' varjazzjoni: Kejl tal-varjabbiltà li huwa kkalkolat għal grupp ta' dejta dwar ir-repliki billi d-devjazzjoni standard tiġi diviża bil-medja. Jista' jiġi mmultiplikat b'100 għall-espressjoni bħala perċentwal.

EC_{1,5}: Il-konċentrazzjoni interpolata għal induzzjoni ta' luċiferazi għal darba u nofs

IC₃₀: Il-konċentrazzjoni li twassal għal tnaqqis ta' 30 % fil-vijabbiltà ċellolari.

IC₅₀: Il-konċentrazzjoni li twassal għal tnaqqis ta' 50 % fil-vijabbiltà ċellolari.

Periklu: Proprietà inerenti ta' agent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-agent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), il-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew grupp ta' sustanzi kimiċi, li tintegra b'mod strutturat u jiżen id-dejta rilevanti kollha sabiex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-htieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

I_{max}: Il-fattur ta' induzzjonali massimali tal-attività ta' luċiferazi meta mqabbla mal-kontroll tas-solvent (negattiv) imkejje f' kwalunkwe konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Keap1: Proteina 1 assoċjata mal-ECH bħall-Kelch, hija proteina sensorjali li tista' tirregola l-attività Nrf2. F'kundizzjonijiet mhux indotti, il-proteina sensorjali Keap1 timmira l-fattur ta' transkrizzjoni tal-Nrf2 għal ubikwitinilazzjoni u degradazzjoni proteolitika fil-proteazoma. Il-modifika kovalenti tar-residwi ta' ċisteina reattiva tal-Keap 1 minn molekoli żgħar tista' twassal għal dissoċjazzjoni ta' Nrf2 minn Keap1 (8) (10) (11).

Tahlita: Tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreagixxux (1).

▼ **M7**

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

Sustanza multikostitwenti: Sustanza, definita mill-kompożizzjoni kwantitattiva tagħha, li fiha iktar minn kostitwent ewlieni wiehed ikun preżenti f'koncentrazzjoni ≥ 10 % (w/w) u < 80 % (w/w). Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' proċess tal-manifattura. Id-differenza bejn tahlita u sustanza multikostitwenti hija li tahlita tinkiseb bl-amalgamar ta' żewġ sustanzi jew iktar minghajr reazzjoni kimika. Sustanza multikostitwenti hija r-riżultat ta' reazzjoni kimika.

Nrf2: Il-fattur nukleari (derivat mill-eritrojde 2)-bħal 2, huwa fattur ta' transkrizzjoni involut fil-passaġġ tar-rispons tal-antiossidanti. Meta Nrf2 ma jkunx ubikwitinilat, jingema' fiċ-ċitoplazma u jittrażloka fin-nukleu, fejn jingħaqad mal-ARE fir-reġjun promotur upstream ta' hafna ġeni ċitoprotettivi, sabiex iniedi t-transkrizzjoni tagħhom (8) (10) (11).

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u trattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun eċċessiv.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-preċiżjoni (konkordanza ta' metodu ta' ttestjar) (29).

Affidabilità: Kejl ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettagħ b'mod riproduttibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettagħ billi jintuza l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproduttibilità fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibilità fl-istess laboratorju (29).

Riproduċibilità: Il-qbil bejn ir-riżultati miksub mill-ittestjar tal-istess sustanza kimika bl-użu tal-istess protokoll tat-test (ara affidabilità) (29).

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (29).

Kontroll tas-solvent/veikolu: Replika li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test hlief is-sustanza kimika tat-test, iżda tinkludi s-solvent li jintuza. Jintuza sabiex jiġi stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent.

Speċifità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mill-metodu ta' ttestjar. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (29).

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv mehtieg għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat minghajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha (1).

Sustanza kimika tat-test: It-terminu "sustanza kimika tat-test" jintuza sabiex jirreferi għal dik li qiegħda tiġi ttestjata.

▼ M7

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' tagħrif dwar is-sikurezza, sabiex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inklużi min ihaddem, il-haddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u l-haddiema tal-emergenza) u l-ambjent (1).

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

Metodu ta' ttestjar validu: Metodu ta' ttestjar meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabilità għal skop speċifiku u li huwa bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Metodu ta' ttestjar qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (29).

▼ M7

Appendiċi 2

SUSTANZI TA' PROFICIENZA

Sensitizzazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-ARE-Nrf2 Luciferase

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-proficienza teknika billi jiksibu b'mod korrett it-tbassir mistenni ta' KeratinoSens™ għall-10 Sustanzi ta' Proficienza rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksibu l-valuri tal-EC_{1,5} u IC₅₀ li jaqgħu fi hdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-inqas 8 mill-10 sustanzi ta' proficienza. Dawn is-sustanzi ta' proficienza ntgħażlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Fost kriterji tal-ghazla oħrajn kien hemm id-disponibilità kummerċjali, id-disponibilità ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja u d-disponibilità ta' dejta *in vitro* ta' kwalità għolja mill-assaġġ KeratinoSens™.

Tabella 1

Sustanzi rakkomandati biex tintwera proficienza teknika mal-assaġġ KeratinoSens™

Sustanzi ta' Proficienza	CASRN	Forma Fizika	Tbassir <i>In Vivo</i> ⁽¹⁾	Tbassir KeratinoSens™ ⁽⁰⁾	Medda ta' Referenza tal-EC _{1,5} (µM) ⁽¹⁾	Medda ta' Referenza tal-IC ₅₀ (µM) ⁽¹⁾
Isopropanol	67-63-0	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Aċidu saliciliku	69-72-7	Solidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Glicerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Negattiv	> 1 000	> 1 000
Alkohol taċ-ċinnamil	104-54-1	Solidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	Pożittiv	25 - 175	> 1 000
Dimetakrilat tal-etilen glikol	97-90-5	Likwidu	Sensitizzatur (dgħajjef)	Pożittiv	5 - 125	> 500
2-Merkaptobenzotjazol	149-30-4	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	Pożittiv	25 - 250	> 500
Glutaronitril tal-metildibromo	35691-65-7	Solidu	Sensitizzatur (qawwi)	Pożittiv	< 20	20 - 100
4-Metilaminofenol sulfat	55-55-0	Solidu	Sensitizzatur (qawwi)	Pożittiv	< 12.5	20 - 200
2,4-Dinitro-klorobenzen	97-00-7	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	Pożittiv	< 12.5	5 - 20

⁽¹⁾ It-tbassiriet tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* huma bbażati fuq dejta tal-LLNA (13). Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (24).

⁽⁰⁾ Tbassir ta' KeratinoSens™ għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 9 u 11 ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

⁽¹⁾ Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (12).

▼ **M7***Appendiċi 3***KONTROLL TAL-KWALITÀ TAL-KEJLIET TAL-LUMINEXXENZA****Esperiment bażiku għall-iżgurar ta' kejl ottimali tal-luminexxenza fl-assaġġ KeratinoSens™**

It-tliet parametri li ġejjin huma kritiċi għall-iżgurar tal-kisba ta' riżultati affidabbli bil-luminometru:

- li jkun hemm biżżejjed sensitività li tagħti sfond stabbli fi bwejriet tal-kontroll;
- li ma jkun hemm ebda gradjent fuq il-pjastra minhabba hinijiet twal tal-qari; u
- li ma jkun hemm ebda kontaminazzjoni ta' dawl fil-bwejriet biswit minn bwejriet attivi hafna.

Qabel l-ittestjar huwa rakkomandat li jiġi żgurat li jkun hemm il-kejl tal-luminexxenza xierqa, billi tiġi ttestjata pjastra tal-kontroll stabbilita kif deskritt hawn taht (analizi tat-triplikati).

L-issettjar tal-pjastri tal-ewwel esperiment ta' tahrig

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Inbjank

EGDMA = Dimetakrilat tal-etilen glikol (Nru CAS: 97-90-5) sustanza kimika b'induzzjoni qawwija

CA = Aldeid ċinnamiku, referenza pożittiva (Nru CAS: 104-55-2)

L-analizi tal-kontroll tal-kwalità għandha turi:

- rispons għad-doża ċar fir-ringiela D, bl- $I_{\max} > 20$ darba ikbar mill-isfond (f'hafna każijiet, jintlaħqu valuri tal- $I_{\max}$ ta' bejn 100 u 300);
- ebda rispons għad-doża fir-ringiela C u E (ebda valur ta' induzzjoni iktar minn 1.5 (idealment mhux iktar minn 1.3) minhabba kontaminazzjoni possibbli tad-dawl, speċjalment qrib bwejriet ferm attivi fir-ringiela tal-EGDMA;
- ebda differenza statistikament sinifikanti bejn ir-ringieli A, B,, E, F u G (jiġifieri ebda gradjent fuq il-pjastra); u
- il-varjabbiltà fi kwalunkwe waħda mir-ringieli A, B,, E, F u G u fil-bwejriet tad-DMSO fir-ringiela H għandha tkun inqas minn 20 % (jiġifieri sfond stabbli).

▼ M7

B.61. METODU TA' TTESTJAR TAT-TNIXXIJA TA' FLUWOREX-XEINA GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TA' KORRUŻIVI OKULARI U IRRITANTI SEVERI

INTRODUZZJONI

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 460 tal-OECD (2012). Il-metodu ta' ttestjar tat-Tnixxija tal-Fluworexxeina huwa metodu ta' ttestjar *in vitro* li jista' jintuża f'ċerti ċirkustanzi u b'limitazzjonijiet speċifiċi sabiex jiġu kklassifikati sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet) bħala korrużivi okulari u irritanti severi, kif definiti mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi (GHS) tan-Nazzjonijiet Uniti (NU) (Kategorija 1), ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Tahlitiet (CLP) ⁽¹⁾ (Kategorija 1), u (Kategorija 1) tal-Aġenzija għall-Protezzjoni tal-Ambjent (EPA) tal-Istati Uniti (1)(2). Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, irritanti okulari severi huma definiti bħala sustanzi kimiċi li jikkawgħu ħsara fit-tessut fl-għajnejn wara l-ghoti tas-sustanza kimika tat-test li ma tkunx reversibbli fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża tħassir fiżiku serju tal-vista, filwaqt li korrużivi okulari huma sustanzi kimiċi li jikkawgħu ħsara irriversibbli fit-tessut tal-għajnejn. Dawn is-sustanzi kimiċi huma klassifikati fil-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE, jew il-Kategorija 1 tal-EPA l-Istati Uniti.

Filwaqt li l-metodu ta' ttestjar tal-FL ma jitqiesx li huwa validu bħala sostitut komplut għat-test *in vivo* fuq l-għajnejn tal-fniek, l-FL huwa rakkomandat sabiex jintuża bħala parti minn strateġija ta' ttestjar sekwenzjali għall-klassifikazzjoni u t-tikkettar regolatorji. B'hekk, l-FL huwa rakkomandat bħala l-ewwel pass fi hdan approċċ minn Fuq għal Isfel sabiex jiġu identifikati korrużivi okulari/irritanti severi, speċifikament għal tipi limitati ta' sustanzi kimiċi (jiġifieri sustanzi u tahlitiet solubbli fl-ilma) (3)(4).

Generalment huwa aċċettat li, fil-futur qarib, ebda test *in vitro* tal-irritazzjoni tal-għajnejn wahdu ma huwa sejjer ikun kapaċi jiehdu post it-test *in vivo* tal-għajnejn (TM B.5 405 (5)) sabiex ibassar il-medda sħiħa ta' irritazzjonijiet għal klassijiet ta' sustanzi kimiċi differenti. Madankollu, it-tahlitiet strateġiċi ta' bosta metodi ta' ttestjar alternattivi fi hdan strateġija ta' ttestjar (sekwenzjali) jaf ikunu jistgħu jiehdu post it-test *in vivo* tal-għajnejn (4). L-approċċ minn Fuq għal Isfel (4) huwa mfassal sabiex jintuża meta, fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, sustanza kimika tkun mistennija li jkollha potenzjal għoli ta' irritazzjoni.

Fuq il-bażi tal-mudell ta' tħassir spjegat fil-paragrafu 35, il-metodu ta' ttestjar tal-FL jista' jidentifika sustanzi kimiċi fi hdan dominju ta' applikabilità limitat bħala korrużivi okulari/irritanti severi (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti) mingħajr ebda test ieħor. L-istess huwa supponut għat-tahlitiet, għad li t-tahlitiet ma ntuzawx fil-validazzjoni. Għaldaqstant, il-metodu ta' ttestjar tal-FL jista' jintuża sabiex jistabbilixxi l-irritazzjoni għall-għajnejn/il-korrużività tas-sustanzi kimiċi, billi tiġi segwita l-istrateġija ta' ttestjar sekwenzjali tat-TM B.5 (5). Madankollu, sustanza kimika li

⁽¹⁾ 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-tahlitiet, 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

▼ M7

mhijiex imbassra bhala korruziv okulari jew irritant sever bil-metodi ta' ttestjar tal-FL ikollha bzonn tigi ttestjata f'metodu ta' ttestjar wiehed jew iktar addizzjonali (*in vitro* u/jew *in vivo*) li kapaçi jidentifika bi preżizzjoni i) sustanzi kimiçi li huma korruziwi okulari/irritanti severi foloz negattivi *in vitro* fl-FL (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti); ii) sustanzi kimiçi li mhumiex ikklassifikati għal korrużjoni/irritazzjoni tal-ghajnejn (Kategorija Nru tal-GHS tan-NU; Ebda Kategorija tal-GHS tan-NU: Kategorija IV tal-EPA tal-Istati Uniti); u/jew iii) sustanzi kimiçi li huma irritanti moderati/hfief għall-ghajnejn (Kategoriji 2A u 2B tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE; Kategoriji II u III tal-EPA tal-Istati Uniti);

L-ghan ta' dan il-metodu ta' ttestjar huwa li jiddeskrivi l-proċeduri użati għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza kimika tat-test li tikkawża korrużività jew irritanza severa potenzjali kif imkejla mill-hila tagħha li tinduçi hsara lil monosaff tal-epitelju konfluwenti impermeabbli. L-integrità tal-permeabilità transepiteljali hija funzjoni ewlenija ta' epitelju bħal dak li jinsab fil-konguntiva u l-kornea. Il-permeabilità transepiteljali hija kkontrollata minn bosta ġunzjonijiet dojoq. Intwera li zieda fil-permeabilità tal-epitelju korneali *in vivo* jikkorrelata mal-livell ta' infjammazzjoni u l-hsara fil-wiċċ osservata hi u tiżviluppa l-irritazzjoni tal-ghajnejn.

Fil-metodu ta' ttestjar tal-FL, l-effetti tossiçi wara hin tal-esponiment qasir għas-sustanza kimika tat-test jitkejlu minn zieda fil-permeabilità tal-fluworexxeina tas-sodju permezz tal-monosaff epiteljali taċ-ċelloli tal-Kilwa Kanina Madin-Darby (MDCK) ikkulturati fuq inserzjonijiet permeabbli. L-ammont ta' tnixxija ta' fluworexxeina li ssehħ huwa proporzjonat għall-hsara indotta mis-sustanza kimika fil-ġunzjonijiet dojoq, il-ġunzjonijiet desmożomali u l-membrani taċ-ċelloli, u jista' jintuża sabiex jiġi stmat il-potenzjal ta' tossiċità okulari ta' sustanza kimika tat-test. L-Appendiċi 1 jipprovi diġramma taċ-ċelloli tal-MDCK imkab-brin fuq membrana li tiddaħhal għall-metodu ta' ttestjar tal-FL.

Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq il-protokoll INVITTOX Nru 71 (6) li ġie evalwat miċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM), f'kollaborazzjoni mal-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interagenzjali tal-Istati Uniti għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM) u ċ-Ċentru Gappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM).

Il-metodu ta' ttestjar tal-FL mhuwiex rakkomandat sabiex jiġu identifikati sustanzi kimiçi li għandhom jiġu kklassifikati bhala irritanti hfief/moderati jew sustanzi kimiçi li ma għandhomx ikunu kklassifikati għal irritazzjoni okulari (sustanzi u tahlitiet) jiġifieri Kat. 2A/2B tal-GHS, ebda kategorija; Kat. 2 tas-CLP tal-UE, ebda kategorija; Kategoriji II/III/IV tal-EPA tal-Istati Uniti), kif muri mill-istudju ta' validazzjoni (3) (7).

Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli biss għal sustanzi kimiçi solubbli fl-ilma (sustanzi u tahlitiet). Il-potenzjal ta' irritazzjoni severa okulari ta' sustanzi kimiçi li huma solubbli fl-ilma u/jew fejn l-effett tossiku mhuwiex affettwat minn dilwizzjoni ġeneralment jitbassar b'mod preċiż bil-metodu ta' ttestjar tal-FL (7). Sabiex sustanza kimika tigi kategorizzata bhala solubbli fl-ilma, f'kundizzjonijiet sperimentali, għandha tkun solubbli f'Soluzzjoni sterili tal-Melħ Bilanċjata ta' Hanks (HBSS) mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalċju (f'koncentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM) f'koncentrazzjoni ta' ≥ 250 mg/ml (doża oghla mil-limitu ta' 100 mg/ml). Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test hija solubbli taht il-koncentrazzjoni ta' 100 mg/ml, iżda diġà tinduçi induzzjoni tal-FL ta' 20 % f'dik il-koncentrazzjoni (jiġifieri $FL_{20} < 100$ mg/ml), xorta wahda tista' tigi kklassifikata bhala tal-Kat. 1 tal-GHS jew Kat. 1 tal-EPA.

Il-limitazzjonijiet identifikati għal dan il-metodu ta' ttestjar jeskludu aċidi u bażijiet b'saħħithom, fissattivi ta' ċelloli u sustanzi kimiçi ferm volatili mid-dominju ta' applikabilità. Dawn is-sustanzi kimiçi għandhom mekkaniżmi li ma jitkejlux mill-metodu ta' ttestjar tal-FL, eż. koagulazzjoni estensia, saponifikazzjoni jew kimiki reattivi speċifiċi. Limitazzjonijiet identifikati oħrajn għal dan il-metodu huma msejsin fuq ir-riżultati għall-kapaċità ta' tbassir għal sustanza kimika tat-test ikkullurita u viskuża (7). Huwa ssuġġerit li ż-żewġ tipi ta' sustanzi kimiçi

▼M7

diffiċli jitnehhew mill-monosaff wara l-perjodu ta' esponiment qasir u li l-prevedibbiltà tal-metodu ta' ttestjar tista' tittejjeb jekk jintuża numru ikbar ta' stadji tal-hasil. Sustanzi kimiċi solidi sospizi f'likwidu għandhom il-propensità li jippreċipitaw 'il barra u ja'f ikun diffiċli li tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni finali għaċ-ċelloli. Meta s-sustanzi kimiċi ta' dawn il-klassijiet kimiċi u fiżiċi jiġu esklużi mid-database, il-preċiżjoni tal-FL skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-UE, l-EPA u l-GHS tittejjeb b'mod sostanzjali (7).

Fuq il-bażi tat-tir ta' dan il-metodu ta' ttestjar (jiġifieri li jidentifika korrużivi okulari/irritanti severi biss), ir-rati ta' foloz negattivi (ara l-Paragrafu 13) mhumieks kritiċi peress li t-tali sustanzi kimiċi mbagħad jiġu ttestjati b'testijiet *in vitro* validati adegwament oħrajn jew fil-fniek, skont ir-rekwiżiti regolatorji, bl-użu ta' strateġija ta' ttestjar sekwenzjali f'approċċ tal-piż tal-evidenza (5) (ara l-paragrafi 3 u 4 ukoll).

Il-limitazzjonijiet identifikati l-oħrajn tal-metodu ta' ttestjar tal-FL huma bbażati fuq rati ta' foloz negattivi u foloz pożittivi. Meta jintuża bħala l-ewwel pass fi h'dan approċċ minn Fuq għal Isfel sabiex jiġu identifikati sustanzi u tahlitiet korrużivi okulari/irritanti severi solubbli fl-ilma (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti), ir-rata ta' foloz pożittivi għall-metodu ta' ttestjar tal-FL varjat minn 7 % (7/103; GHS tan-NU u CLP tal-UE) sa 9 % (9/99; EPA tal-Istati Uniti) u r-rata ta' foloz negattivi varjat minn 54 % (15/28; EPA tal-Istati Uniti) sa 56 % (27/48; GHS tan-NU u CLP tal-UE) meta mqabblin ma' riżultati *in vivo*. Il-gruppi ta' sustanzi kimiċi li juru riżultati ta' foloz pożittivi u/jew foloz negattivi fil-metodu ta' ttestjar tal-FL mhumieks definiti hawnhekk.

Ċerti limitazzjonijiet tekniċi huma speċifiċi għall-kultura taċ-ċelloli tal-MDCK. Il-ġunzjonijiet dojoq li jimblokkaw il-passaġġ tal-kulurant fluworexxein mill-monosaff dejjem jiġu friskju ikbar minhabba numru dejjem ikbar ta' passaġġi ta' ċelloli. Formazzjoni inkompluta tar-riżultati tal-ġunzjonijiet dojoq f'FL ikbar fil-kontroll mhux ittrattat. Għaldaqstant, tnixxija massimali permessibbli definita fil-kontrolli mhux ittrattati hija importanti (ara l-paragrafu 38: tnixxija 0 %). Bhal bl-assaġġi *in vitro* kollha, hemm il-potenzjal li ċ-ċelloli jiġu ttrasformati maż-żmien, u b'hekk huwa vitali li jinbdew il-meded tan-numru ta' passaġġi għall-assaġġi.

Id-dominju ta' applikabilità attwali jista' jgħodd f'ċerti każijiet, iżda biss wara li jiġi analizzat sett ta' dejta mifrux ta' sustanzi kimiċi tat-test studjati, idealment miksub wara testijiet (3). Dan il-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi aġġornat kif xieraq iktar ma jkun hemm informazzjoni u dejta godda kkunsidrati.

Għal kwalunkwe laboratorju li inizjalment ikun qed jistabbilixxi dan l-assaġġ, għandhom jintużaw is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza pprovduti fl-Appendiċi 3. Il-laboratorji jistgħu jużaw dawn is-sustanzi kimiċi sabiex juru l-kompetenza teknika tagħhom fit-twettiq tal-metodu ta' ttestjar tal-FL qabel ma jissottomettu dejta tal-assaġġ tal-FL għall-finijiet tal-klassifikazzjoni regolatorja tal-perikli.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-metodu ta' ttestjar tal-FL huwa assaġġ *in vitro* bbażat fuq il-funzjoni taċ-ċelloli u ċ-ċitotossicità li jsir fuq monosaff konfluwenti ta' ċelloli tal-epitelju tubulari CB997 tal-MDCK li jitkabbru fuq inserzjonijiet semipermeabbli u jimmudellaw l-istat mhux proliferanti tal-epitelju korneali *in vivo*. Il-linja ta' ċelloli tal-MDCK hija ferm stabbilita u tiffirma ġunzjonijiet dojoq u ġunzjonijiet desmosomali simili għal dawk li jinstabu fuq in-naha apika tal-epitelju tal-konguntiva u tal-kornea. Ġunzjonijiet dojoq u desmosomali *in vivo* jipprevjenu soluti u materjali estranei milli jippenetraw l-epitelju tal-kornea. It-telfien tal-impermeabilità transepiteljali, minhabba l-ġunzjonijiet dojoq u l-ġunzjonijiet desmosomali li jgħarrbu hsara, huwa wiehed mill-avvenimenti bikrin fl-irritazzjoni okulari indotta mis-sustanzi kimiċi.

▼ **M7**

Is-sustanza kimika tat-test hija applikata għas-saff konfluwenti ta' ċelloli mkab-brin fuq in-naħa apika tal-inserzjoni. Normalment tintuża esponizzjoni qasira ta' minuta sabiex tirrifletti r-rata ta' kkljar normali fl-esponimenti tal-bniedem. Vantaġġ tal-perjodu ta' esponiment qasir huwa li s-sustanzi u t-tahlitiet ibbażati fuq l-ilma jistgħu jiġu ttestjati puri, jekk ikunu jistgħu jitnehhew faċilment wara l-perjodu tal-esponiment. Dan jippermetti li jsiru paraguni iktar diretti tar-rizultati mal-effetti kimiċi fil-bniedem. Imbagħad is-sustanza kimika tat-test titneħħa u l-kulurant fluworexxein tas-sodju ferm fluworexxenti u mhux tossiku jizdied man-naħa apika tal-monosaff għal 30 minuta. Il-ħsara kkaġunata mis-sustanza kimika tat-test fil-ġunzjonijiet doġoq tiġi stabbilita bl-ammont ta' fluworexxeina li tnixxi minn ġos-saff taċ-ċelloli fi hdan perjodu ta' hin definit.

L-ammont ta' kulurant fluworexxein tas-sodju li jgħaddi minn ġol-monosaff u l-membrana tal-inserzjoni f'volum stabbilit ta' soluzzjoni preżenti fil-bwejra (li fiha jnixxi l-kulurant fluworexxein tas-sodju) jiġi stabbilit billi titkejjel spettrofluorometrikament il-konċentrazzjoni ta' fluworexxeina fil-bwejra. L-ammont ta' tnix-xija tal-fluworexxeina (FL) jiġi kkalkolat b'referenza għall-valuri tal-intensità tal-fluworexxenza (FI) miż-żewġ kontrolli: kontroll inbjank, u kontroll tat-tnixxija massima. Il-perċentwal ta' tnixxija u, għalhekk, l-ammont ta' ħsara fl-iġunzjo-nijiet doġoq huma espressi, b'rabta ma' daww il-kontrolli, għal kull waħda mill-konċentrazzjonijiet stabbiliti tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad, jiġi kkalkolat l-FL₂₀ (jiġifieri l-konċentrazzjoni li tikkawża FL ta' 20 % b'rabta mal-valur irre-ġistrat għall-monosaff konfluwenti mhux ittrattat u l-inserzjonijiet mingħajr ċelloli). Il-valur tal-FL₂₀ (mg/ml) jintuża fil-mudell ta' tbassir għall-identifikaz-zjoni ta' korrużivi okulari u irritanti severi (ara l-paragrafu 35).

L-irkupru għandu sehem importanti mill-profil tat-tossicità ta' sustanza kimika tat-test li jiġi vvalutat mit-test ta' irritazzjoni okulari *in vivo* wkoll. L-analiżijiet preliminari indikaw li d-dejta dwar l-irkupru (sa 72 siegħa wara l-esponiment għas-sustanza kimika tat-test) tista' potenzjalment iżżid il-kapaċità ta' tbassir tal-Protokoll 71 ta' INVITTOX iżda hemm bżonn ta' iktar evalwazzjoni u tkun tibbenefika minn dejta addizzjonali, idealment miksub b'iktar testijiet (6). Dan il-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi aġġornat kif xieraq iktar ma jkun hemm informaz-zjoni u dejta godda kkunsidrati.

PROCEDURA**Preparazzjoni tal-monosaff ċellolari**

Il-monosaff taċ-ċelloli CB997 tal-MDCK jithejja bl-użu ta' ċelloli sottokonflu-wenti li jikbru fi flasks tal-kultura taċ-ċelloli f'DMEM/Tahlita tan-Nutrijenti F12 (1x konċentrat b'L-glutamina, 15 mM HEPES, kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM) u 10 % FCS/FBS inattivat bis-shana). Fuq kollox, il-media/is-soluzzjo-nijiet kollha użati fi hdan l-assaġġ tal-FL għandu jkun fihom kalċju f'konċentraz-zjoni ta' bejn 1.8 mM (200 mg/l) u 1.0 mM (111 mg/l) sabiex jiġu żgurati formazzjoni u integrità tal-ġunzjonijiet doġoq. Il-medda tan-numru ta' passaġġi ta' ċelloli għandha tiġi kkontrollata sabiex tiġi żgurata formazzjoni bbilanjata u riproducibbli tal-ġunzjonijiet doġoq. Idealment, iċ-ċelloli għandhom ikunu fi hdan il-medda ta' passaġġi 3-30 mit-tahlil peress li iċ-ċelloli fi hdan din il-medda ta' passaġġi għandhom funzjonalità simili, li tgħin sabiex ir-rizultati tal-assaġġ ikunu riproducibbli.

Qabel ma jsir il-metodu ta' ttestjar tal-FL, iċ-ċelloli jinqalgħu mill-flask bi tripsi-nizzazzjoni, jiġu ċentrifugati u ammont xieraq ta' ċelloli jinżera' fl-inserzjonijiet imqegħdin fi pjastri b'24 bwejra (ara l-Appendiċi 1). Għat-tizriġ taċ-ċelloli għandhom jintużaw inserzjonijiet b'dijametru ta' tnax-il mm b'membrana ta' ester i taċ-ċelluloża mħallta, h-xuna ta' 80-150 µm u qies tal-pori ta' 0.45 µm. Fl-istudju ta' validazzjoni, intużaw inserzjonijiet Millicell-HA ta' 12-il mm. Il-proprietajiet tat-tip ta' inserzjoni u membrana huma importanti peress li dawn jistgħu jaffettwaw it-kabbir taċ-ċelloli u l-irbit tas-sustanza kimika. Ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi jistgħu jaqdbu mal-membrana tal-inserzjoni Millicell-HA, xi haġa li tista' taffettwa l-interpretazzjoni tar-rizultati. Is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza (ara l-Appendiċi 3) għandhom jintużaw sabiex tintwera l-ekwivalenza jekk jintużaw membrani oħrajn.

▼ **M7**

L-irbit tas-sustanza kimika mal-membrana tal-inserzjoni huwa iktar komuni għal sustanzi kimiċi katjonici, bħall-klorur tal-benzalkonju, li huma attratti għall-membrana ċċargjata (7). Is-sustanza kimika li torbot mal-membrana tal-inserzjoni tista' żżid il-perjodu ta' esponiment għas-sustanza kimika, xi haġa li twassal għal sopralutazzjoni tal-potenzjal tossiku tas-sustanza kimika, iżda tista' tnaqqas ukoll it-tnixxija fiżika ta' fluworexxeina minn għal-inserzjoni bl-irbit tal-kulurant mas-sustanza kimika katjonika marbuta mal-membrana tal-inserzjoni, u dan iwassal għal sottovalutazzjoni tal-potenzjal tossiku tas-sustanza kimika. Dan jista' jiġi ssorveljat minnufih billi l-membrana waħedha tiġi esposta għall-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika ttestjata u mbagħad jiġi ddied il-kulurant tal-fluworexxeina tas-sodju bil-konċentrazzjoni normali għall-hin standard (ebda kontroll taċ-ċelloli). Jekk isehh l-irbit tal-kulurant tal-fluworexxeina tas-sodju, il-membrana tal-inserzjoni tidher safra wara li jitlahlah il-materjal tat-test. Għalhekk, huwa essenzjali li wiehed ikun jaf x'inhuma l-proprietajiet ta' rbit tas-sustanza kimika tat-test sabiex ikun jista' jinterpreta l-effett tas-sustanza kimika fuq iċ-ċelloli.

It-tizriġ taċ-ċelloli fuq inserzjonijiet għandu jipproduċi monosaff konfluwenti fi żmien l-esponiment għas-sustanza kimika. $1,6 \times 10^5$ ċellola f'kull inserzjoni (400 μ l ta' sospensjoni taċ-ċelloli b'densità ta' 4×10^5 ċellola / ml). F'dawn il-kundizzjonijiet, normalment monosaff konfluwenti jinkiseb wara 96 siegħa fil-kultura. L-inserzjonijiet għandhom jiġu eżaminati viżwalment qabel it-tizriġ, sabiex jiġi żgurat li kwalunkwe hsara rreġistrata fil-kontroll viżiv deskritta fil-paragrafu 30 hija dovuta għall-immaniġġjar.

Il-kulturi taċ-ċelloli tal-MDCK għandhom jinżammu f'inkubaturi f'atmosfera umdifikata, $5\% \pm 1\%$ CO₂ u 37 ± 1 °C. Iċ-ċelloli għandhom ikunu hiesla minn kontaminazzjoni minn batterji, wajrusis, mikroplazma u fungi.

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

Għandha tithejja soluzzjoni ewlenija ġdida tas-sustanza kimika tat-test għal kull sessjoni sperimentali u tintuża fi żmien 30 minuta mit-thejjija. Is-sustanzi kimiċi tat-test għandhom jithejjew f'HBSS li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM), mingħajr fenol aħmar sabiex jiġi evitat l-irbit tal-proteina tas-seru. Qabel l-ittestjar għandha tiġi vvalutata s-solubilità tas-sustanza kimika f'250 mg/ml fl-HBSS. Jekk f'din il-konċentrazzjoni s-sustanza kimika tiffirma sospensjoni jew emulsjoni stabbli (jiġifieri żżomm uniformità u ma tisedimentax u lanqas ma tisepara f'iktar minn fażi waħda) fi 30 minuta, l-HBSS xorta waħda tista' tintuża bħala solvent. Madankollu, jekk jinstab li s-sustanza kimika hija insolubbli fl-HBSS f'din il-konċentrazzjoni, għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' metodi ta' ttestjar oħrajn minflok l-FL. L-użu ta' żejt minerali hafif bħala solvent, f'każijiet li fihom jinstab li s-sustanza kimika hija insolubbli fl-HBSS, għandu jiġi kkunsidrat bir-reqqa peress li ma hemmx biżżejjed dejta għad-dispożizzjoni sabiex tinhareġ konklużjoni fuq it-twetliq tal-assaġġ tal-FL f'dawn il-kundizzjonijiet.

Is-sustanzi kimiċi kollha li jkunu sejrini jiġu ttestjati jithejjew f'HBSS sterili mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM) mis-soluzzjoni ewlenija, f'ħames konċentrazzjonijiet dilwiti fuq bażi ta' piż skont il-volum: 1, 25, 100, 250 mg/ml u soluzzjoni pura jew saturata. Meta tiġi ttestjata sustanza kimika solida, għandha tkun inkluża konċentrazzjoni għolja hafna ta' 750 mg/ml. Din il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika jaf ikollha tiġi applikata fuq iċ-ċelloli bl-użu ta' pipetta bi spostament pożittiv. Jekk jinstab li t-tossicità taqna' bejn 25 u 100 mg/ml, il-konċentrazzjonijiet addizzjonali li ġejjin għandhom jiġu ttestjati darbtejn: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. Il-valur tal-FL₂₀ għandu jinkiseb minn dawn il-konċentrazzjonijiet diment li jkunu ġew issodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni.

Is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu applikati għall-monosaffi taċ-ċelloli konfluwenti wara li jitneħħa l-medium tal-kultura taċ-ċelloli u wara hasil darbtejn b'HBSS sterili, shuna (37 °C), mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalċju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM). Qabel, il-filtri jkunu ġew ivverifikati viżwalment għal xi hsarat preeżistenti li jistgħu jiġu attribwiti bi żball għal inkompatibilitajiet potenzjali mas-sustanzi kimiċi tat-test. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet repliki għal kull

▼ **M7**

konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u għall-kontrolli f'kull sessjoni. Wara minuta esponiment f'temperatura ambjentali, is-sustanza kimika tat-test għandha tinnehha bil-galbu bl-aspirazzjoni, il-monosaff għandu jinhasel darbtejn b'HBSS sterili, shuna (37 °C), mingħajr fenol aħmar li fiha l-kalcju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM), u t-niixxija tal-fluorexxeina għandha titkejjel minnufih.

Għandhom jintużaw kontrolli negattivi (NC) u pozittivi (PC) paralleli f'kull sessjoni sabiex jintwera li l-integrità tal-monosaff (NC) u s-sensittività taċ-ċelloli (PC) jaqgħu fi hdan medda ta' aċċettazzjoni storika definita. Is-sustanza kimika tal-PC issuggerita hija Brij 35 (Nru CAS 9002-92-0) f'100 mg/ml. Din il-konċentrazzjoni għandha tagħti tniixxija tal-fluorexxeina ta' madwar 30 % (medda aċċettabbli ta' tniixxija tal-fluorexxeina hija ta' 20-40 %, jiġifieri hsara fis-saff taċ-ċellola). Is-sustanza kimika tal-NC issuggerita hija f'HBSS (mhux ittrattata, kontroll inbjank) li fiha l-kalcju (f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM), mingħajr fenol aħmar. Kontroll tat-tniixxija massima għandu jkun inkluż f'kull sessjoni wkoll sabiex ikunu jistgħu jiġu kkalkolati l-valuri tal-FL₂₀. It-tniixxija massima hija stabbilita billi jintużaw inserzjonijiet tal-kontroll mingħajr ċelloli.

Determinazzjoni tal-permeabilità tal-fluorexxeina

Eżatt wara li jitnehhew is-sustanzi kimiċi tat-test u tal-kontroll, jiżdiedu mal-inserzjonijiet (eż. Millicell-HA) 400µl ta' 0.1 mg/ml soluzzjoni tal-fluorexxeina tas-sodju (0.01 % (w/v) f'HBSS li fiha l-kalcju [f'konċentrazzjoni ta' 1.0-1.8 mM], mingħajr fenol). Il-kulturi jinżammu għal 30 minuta f'temperatura ambjentali. Fi tmien l-inkubazzjoni bil-fluorexxeina, l-inserzjonijiet jitnehhew bil-galbu minn kull bwejra. Il-verifika viżwali ssir fuq kull filtru u tiġi rreġistrata kwalunkwe hsara li setgħet sehhet matul l-immaniġġjar.

L-ammont ta' fluorexxeina li nixxiet mill-monosaff u l-inserzjoni huwa kkwantifikat fis-soluzzjoni li jibqa' fil-bwejriet wara t-tnehhija tal-inserzjonijiet. Il-kejl isir fi spettrofluorometru f'tul ta' mewġa tal-eċċitazzjoni u l-emissjoni ta' 485 nm u 530 nm, rispettivament. Is-sensittività tal-ispettrofluorometru għandha tiġi ssettjata sabiex ikun hemm l-ikbar differenza numerika bejn l-FL massima (inserzjoni mingħajr ċelloli) u l-FL minima (inserzjoni b'monosaff konfluwenti ttrattati bl-NC). Minhabba d-differenzi fl-ispettrofluorometru użat, huwa ssuggerit li tintuża sensittività li tagħti intensità tal-fluorexxenza ta' > 4 000 fil-kontroll tat-tniixxija massima tal-fluorexxeina. Il-valur massimu tal-FL ma għandux ikun ikbar minn 9999. L-intensità tat-tniixxija massima tal-fluorexxenza għandha taqa' fi hdan il-medda lineari tal-ispettrofluorometru użat.

Interpretazzjoni tar-riżultati u l-mudell ta' tbassir

L-ammont ta' FL huwa proporzjonat għall-hsara indotta mis-sustanza kimika fil-gunzjonijiet doġoq. Il-perċentwal ta' FL għal kull konċentrazzjoni ttestjata tas-sustanza kimika jiġi kkalkolat mill-valuri tal-FL miksubin għas-sustanza kimika tat-test b'referenza għall-valuri FL mill-NC (qari tal-valuri mill-monosaff konfluwenti taċ-ċelloli ttrattati bl-NC) u kontroll tat-tniixxija massima (qari tal-valuri għall-ammont ta' FL minn go inserzjoni mingħajr ċelloli).

L-intensità tal-fluorexxenza tat-tniixxija massima medja = x

L-intensità tal-fluorexxenza tat-tniixxija 0 % medja = y

It-tniixxija 100 % medja tinkiseb bit-tnaqqis tat-tniixxija 0 % medja mit-tniixxija massima medja,

jiġifieri $x - y = z$

It-tniixxija perċentwali għal kull doża fissa tinkiseb bit-tnaqqis tat-tniixxija 0 % mill-intensità tal-fluorexxenza medja tat-tliet valuri tar-repliki (m), u bid-diviżjoni ta' dan il-valur bit-tniixxija 100 %, jiġifieri $\%FL = [(m-y) / z] \times 100 \%$, fejn:

▼M7

m = l-intensità tal-fluworexxenza medja tat-tliet kejljet tar-repliki għall-konċentrazzjoni involuta

% FL = il-perċentwal tal-fluworexxenza li tnixxi minn ġos-saff taċ-ċelloli

Għandha tiġi applikata l-ekwazzjoni li ġejja għall-kalkolu tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li tikkaguna l-FL 20 %:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Fejn:

D = % tal-inibizzjoni

A = % hsara (20 % tnixxija tal-fluworexxenza)

B = % tnixxija tal-fluworexxenza < A

C = % tnixxija tal-fluworexxenza > A

M_C = Konċentrazzjoni (mg/ml) ta' C

M_B = Konċentrazzjoni (mg/ml) ta' B

Il-valur limitu tal-FL₂₀ għat-tbassir tas-sustanzi kimiċi bħala korrużivi okulari/irritanti severi jingħata hawn taht:

FL ₂₀ (mg/ml)	C&L tal-GHS tan-NU	C&L tas-CLP tal-UE	C&L tal- EPA tal-Istati Uniti
≤ 100	Kategorija 1	Kategorija 1	Kategorija I

C&L: klassifikazzjoni u tikkettar

Il-metodu ta' ttestjar tal-FL huwa rakkomandat biss għall-identifikazzjoni ta' korrużivi okulari u irritanti severi solubbli fl-ilma (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU, Kategorij 1 tas-CLP tal-UE, Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti) (ara l-paragrafi 1 u 10).

Sabiex is-sustanzi kimiċi solubbli fl-ilma (sustanzi u taħlitiet) (3) (6) (7) jiġu identifikati bħala “li jinduċu hsara serja lill-ghajnejn” (Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP tal-UE) jew bħala “korrużiv okulari jew irritant sever” (Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti), is-sustanza kimika tat-test għandha tinduċi valur tal-FL₂₀ ta' ≤ 100 mg/ml.

Aċċettazzjoni tar-riżultati

Il-valur tat-tnixxija medja massima (x) għandu jkun oghla minn 4 000 (ara l-paragrafu 31), it-tnixxija 0 % medja (y) għandha tkun 300 jew inqas, u t-tnixxija 100 % medja (z) għandha tkun bejn 3 700 u 6 000.

Test jitqies aċċettabbli jekk il-kontroll pozittiv jipproduċi hsara ta' 20 % sa 40 % fis-saff taċ-ċellola (kejl bħala % tat-tnixxija tal-fluworexxenza).

DEJTA U RAPPORTAR

Dejta

Għal kull sessjoni, id-dejta minn bwejriet individwali ta' replika (eż., valuri tal-intensità tal-fluworexxenza u dejta tal-FL perċentwali kkalkolata għal kull sustanza kimika tat-test, inkluża l-klassifikazzjoni) għandha tiġi rrapportata f'forma ta' tabella. Barra minn hekk, għandhom jiġu rrapportati l-medji ± SD tal-kejljet tar-repliki individwali f'kull sessjoni.

▼ **M7****Rapport tat-test**

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

Sustanzi Kimiċi tat-Test u tal-Kontroll

- Isem tas-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) pereżempju l-isem strutturali użat mill-Chemical Abstracts Service (CAS), segwit minn ismijiet oħrajn, jekk ikunu magħrufin;
- Numru CAS tas-sustanza kimika, jekk magħruf;
- Il-purità u l-kompożizzjoni tas-sustanza jew it-tahlita (f'perċentwal(i) skont il-piż), sakemm din l-informazzjoni tkun disponibbli;
- Il-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti għat-twettiq tal-istudju (eż. l-istat fiżiku, il-volatilità, il-pH, l-istabilità, is-solubilità fl-ilma, il-klassi tas-sustanza kimika);
- It-trattament tas-sustanza kimika tat-test/tal-kontroll qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (eż. tishin, thin);
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin;

Ġustifikazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u tal-Protokoll Użati

- Għandha tinkludi kunsiderazzjonijiet dwar id-dominju tal-applikabilità u l-limitazzjonijiet tal-metodu ta' ttestjar;

Kundizzjonijiet tat-test

- Deskrizzjoni tas-sistema ta' ċelloli użata, inkluż ċertifikat tal-awtentiċità u l-istatus tal-mikroplazma tal-linja ta' ċelloli;
- Dettalji tal-proċedura tat-test użata;
- Is-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) tat-test użata;
- Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test;
- Id-durata tal-inkubazzjoni bil-fluworexxena;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni użati;
- Referenza għad-dejta storika tal-mudell (eż. kontrolli negattivi u pożittivi, sustanzi kimiċi ta' referenza, jekk applikabbli);
- Informazzjoni dwar il-profiċjenza teknika murija mil-laboratorju;

Ir-riżultati

- It-tqassim f'tabella tad-dejta miksuba minn sustanzi kimiċi tat-test u l-kontrolli individwali għal kull sessjoni u kull kejl tar-repliki (inklużi riżultati individwali, medji u SDs individwali);
- Il-klassifikazzjoni(jiet) derivata b'referenza għall-mudell ta' tbassir u/jew il-kriterji tad-deċiżjoni użati;
- Deskrizzjoni ta' effetti osservati oħrajn;

▼ **M7***Diskussjoni tar-Riżultati*

— Għandha tinkludi kunsiderazzjonijiet dwar eżitu mhux konkluziv (paragrafu 35: FL₂₀ > 100 mg/ml) u iktar testijiet;

Konkluzjonijiet.

TAGHRIF

- (1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- (2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.
- (4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9
- (5) Il-Kapitolu B.5 ta' dan l-Anness, *Irritazzjoni/korrużjoni akuta tal-ġhajnejn*
- (6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Disponibbli fuq: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>]
- (7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.
- (8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼ M7*Appendiċi 1***DIJAGRAMMA TA' ĊELLOLI MDCK IMKABBRIN FUQ MEMBRANA
LI TIDDAHHAL GHALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-FL**

Saff konfluwenti ta' ċelloli MDCK jitkabbar fuq il-membrana semipermeabbli ta' inserzjoni. L-inserzjonijiet jitqiegħdu fil-bwejrjet ta' pjastri b'24 bwejra.

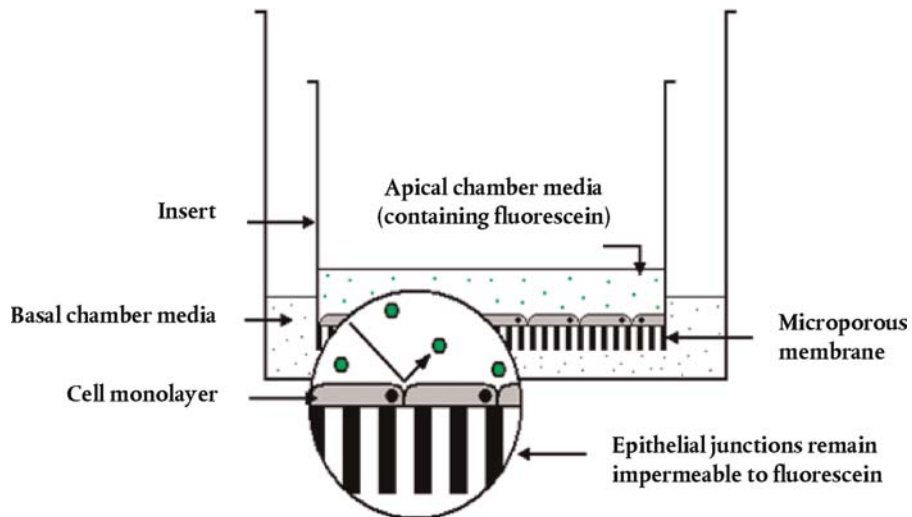


Figura meħuda minn: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼ **M7***Appendiċi 2***DEFINIZZJONIJIET**

Preċiżjoni: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tal-metodu ta' ttestjar u l-valuri ta' referenza aċċettati. Hija kejl tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar u wiehed mill-aspetti ta' "rilevanza". It-terminu jintuża spiss minflok "konkordanza" sabiex ifisser il-proporzjon ta' riżultati tajbin tal-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita.

Kategorija I tal-EPA: Sustanzi kimiċi li jipproduċu involviment korrużiv (qerda irriversibbli tat-tessut okulari) jew involviment tal-kornea jew irritazzjoni li tippersisti għal aktar minn 21 jum (2).

CLP tal-UE (Ir-Regolament (KE) Nru 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikkettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Tahlitiet): Timplimenta fl-Unjoni Ewropea (UE) is-sistema tal-GHS tan-NU għall-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u tahlitiet).

Rata ta' negattivi foloz: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi kollha identifikati b'mod falz bħala negattivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

Rata ta' foloz pożittivi: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi kollha identifikati b'mod falz bħala pożittivi permezz ta' metodu ta' ttestjar. Dan huwa wiehed mill-indikaturi tal-prestazzjoni tal-metodu ta' ttestjar.

FL₂₀: Tista' tiġi stmata bid-determinazzjoni tal-koncentrazzjoni li fiha s-sustanza kimika ttestjata tikkawża 20 % tat-tnixxija tal-fluworexxeina mis-saff taċ-ċelloli.

Tnixxija tal-fluworexxeina: L-ammont ta' fluworexxeina li jghaddi minn gos-saff taċ-ċellola, imkejje spetrofluorometrikament.

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

Kategorija 1 tal-GHS: Il-produzzjoni ta' hsara fit-tessut fl-ghajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wieċ quddiem tal-ghajn, li ma jkunux riversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni.

Periklu: Proprietà inerenti ta' aġent jew sitwazzjoni li għandhom il-potenzjal li jikkawżaw effetti avversi meta organizzmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

Tahlita: Użata fil-kuntest tal-GHS tan-NU bħala tahlita jew soluzzjoni msawra minn żewġ sustanzi jew iktar li fiha ma jirreaġixxux.

Kontroll negattiv: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll ohrajn sabiex jiġi ddeterminat jekk is-solvent ikollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

▼ **M7**

Mhux ikklassifikati: Sustanzi kimiċi li mhumiex ikklassifikati bħala tal-Kategoriji 1, 2A jew 2B tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 jew 2 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal-Kategorija I, II jew III tal-EPA tal-Istati Uniti.

Korrużiva okulari: (a) Sustanza kimika li tikkawża ħsara irreversibbli fit-tessut għall-ghajnejn; (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal-Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti.

Irritanti okulari: (a) Sustanza kimika li tipproduċi bidla reversibbli fl-ghajnejn wara l-applikazzjoni fil-wieċ anterjuri tal-ghajnejn; (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala tal-Kategoriji 2A jew 2B tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 2 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal-Kategorija II jew III tal-EPA tal-Istati Uniti.

Irritant sever għall-ghajnejn: (a) Sustanza kimika li tikkawża ħsara fit-tessut tal-ghajnejn wara li tiġi applikata fuq is-superfiċje anterjuri tal-ghajnejn u li ma tkunx reversibbli fi żmien 21 jum tal-applikazzjoni jew tikkawża tħassir fiżiku serju tal-vista. (b) Sustanzi kimiċi li huma klassifikati bħala irritanti tal-Kategorija 1 tal-GHS tan-NU; il-Kategorija 1 tas-CLP tal-UE; jew irritanti okulari tal-Kategorija I tal-EPA tal-Istati Uniti.

Kontroll pożittiv: Replika li jkun fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test u ttrattata b'sustanza li jkun magħruf li tikkawża rispons pożittiv. Sabiex jiġi żgurat li l-varjabilità fir-rispons tal-kontroll pożittiv tkun tista' tiġi vvalutata tul iż-żmien, id-daqs tar-rispons pożittiv ma għandux ikun estrem.

Sustanzi Kimiċi ta' Profiċjenza: Sottosett tal-lista ta' Sustanzi Kimiċi ta' Referenza li jistgħu jintużaw minn laboratorju naïve sabiex juri profiċjenza bil-metodu ta' ttestjar ta' referenza vvalidat.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-preċiżjoni (konkordanza ta' metodu ta' ttestjar) (8).

Affidabilità: Kejliet ta' kemm metodu ta' ttestjar jista' jitwettaq b'mod riproduttibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Tiġi vvalutata bil-kalkolu tar-riproduċibilità fil-laboratorju u bejn laboratorji u ieħor u r-ripetibilità fil-laboratorju.

Test ta' sostituzzjoni: Test li huwa mfassal sabiex jiehu post test li huwa fużu ta' rutina u aċċettat għall-identifikazzjoni tal-periklu u/jew il-valutazzjoni tar-riskji, u li ġie stabbilit li jipprovdi protezzjoni ekwivalenti jew imtejba tas-saħħa tal-bniedem jew tal-annimali jew l-ambjent, skont kif ikun applikabbli, meta mqabbel mat-test aċċettat, għas-sitwazzjonijiet u s-sustanzi kimiċi ta' ttestjar possibbli kollha.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorjiċi, u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' metodu ta' ttestjar (8).

Ħsara serja lill-ghajnejn: Hija l-produzzjoni ta' ħsara fit-tessut fl-ghajnejn, jew tnaqqis fiżiku serju tal-vista, wara li tiġi applikata sustanza kimika fuq il-wieċ quddiem tal-ghajnejn, li ma jkunx reversibbli fi żmien 21 jum mill-applikazzjoni.

Kontroll tas-solvent/veikolu: Kampjun mhux ittrattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test, inkluż is-solvent jew il-veikolu li jiġi pproċessat mal-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn sabiex jiġi

▼ **M7**

stabbilit ir-rispons bażi għall-kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta fl-istess solvent jew veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll negattiv parallel, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent jew il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hija kejl tal-preċiżjoni għal metodu ta' ttestjar li jipproduċi riżultati kategorici u hija kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-rilevanza ta' metodu ta' ttestjar.

Sustanza: Użata fil-kuntest tal-GHS tan-NU bħala elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksubin bi kwalunkwe proċess ta' produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv mehtieg għall-preservazzjoni tal-istabilità tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, imma eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat minghajr ma jaffetwa l-istabilità tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha.

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

Strategija ta' ttestjar sekwenzjali: Strategija ta' ttestjar gradwali li biha l-informazzjoni eżistenti kollha dwar sustanza kimika tat-test tiġi riveduta, f'ordni speċifiku, permezz ta' proċess tal-piż tal-evidenza f'kull livell sabiex jiġi ddeterminat jekk hemmx biżżejjed informazzjoni disponibbli għal deċiżjoni dwar il-klassifikazzjoni tal-periklu, qabel ma wiehed jgħaddi għal-livell li jmiss. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, ma jkun mehtieg l-ebda ttestjar ieħor. Jekk il-potenzjal ta' irritazzjoni ta' sustanza kimika tat-test ma jkunx jista' jiġi assenjat fuq il-bażi tal-informazzjoni eżistenti, għandha ssir proċedura ta' ttestjar sekwenzjali fuq l-animali sakemm tkun tista' ssir klassifikazzjoni mhux ekwivoka.

Metodu ta' ttestjar invalidat: Metodu ta' ttestjar li għalih ikunu tlestew studji ta' validazzjoni sabiex tiġi ddeterminata r-rilevanza (inkluża l-preċiżjoni) u l-affidabilità għal għan speċifiku. Ta' min jinnota li jista' jkun li metodu ta' ttestjar invalidat ma jkollux prestazzjoni tajba biżżejjed f'termini ta' preċiżjoni u affidabilità sabiex jitqies aċċettabli għall-għan propost (8).

Piż tal-evidenza: Il-proċess fejn jitqiesu l-qawwiet u d-dgħufijiet ta' biċċiet ta' informazzjoni varji sabiex tintlaħaq u tiġi appoġġata konkluzjoni rigward il-potenzjal ta' sustanza kimika li tkun ta' periklu.

▼ M7

Appendiċi 3

SUSTANZI KIMIĊI TA' PROFIĊJENZA GHALL-METODU TA' TTESTJAR TAL-FL

Qabel l-użu ta' rutina ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jidentifikaw b'mod korrett il-klassifikazzjoni tal-korrużività okulari tat-8 sustanzi kimiċi rrakkomandati fit-Tabella 1. Dawn is-sustanzi kimiċi ntgħazlu sabiex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal koorużjoni/irritazzjoni tal-ghajnejn, li hija bbażata fuq ir-riżultati fit-test *in vivo* fuq l-ghajnejn tal-fniek (TG 405, TM B.5(5)) (jiġifieri l-Kategoriji 1, 2A, 2B jew Mhux Ikklassifikati skont il-GHS tan-NU). Madankollu, fid-dawl tal-utilità vvalidata tal-assaġġ FL (jiġifieri li jidentifika korrużivi okulari/irritanti severi biss), hemm biss żewġ eżiti tat-test għall-finijiet ta' klassifikazzjoni (korrużivi/irritanti severi jew mhux korrużivi/irritanti mhux severi) sabiex tintwera l-profiċjenza. Kriterji tal-ghazla oħrajn kienu li s-sustanzi kimiċi huma disponibbli fis-suq, li hemm dejta ta' referenza *in vivo* ta' kwalità għolja għad-dispożizzjoni, u li hemm dejta ta' kwalità għolja miksuba mill-metodu ta' ttestjar tal-FL. Għal din ir-raġuni, is-sustanzi kimiċi ta' profiċjenza ntgħazlu mill-“Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing” (8), li ntuza għall-validazzjoni retrospettiva tal-metodu ta' ttestjar tal-FL

Tabella 1

Is-sustanzi kimiċi rrakkomandati għall-wiri tal-profiċjenza teknika bl-FL

Sustanza Kimika	NRU CAS	Klassi kimika ⁽¹⁾	Forma Fizika	Klassifikazzjoni In Vivo ⁽²⁾	Klassifikazzjoni <i>In Vitro</i> ⁽³⁾
Klorur tal-benzalkonju (5 %)	8001-54-5	Kompost tal-onju	Likwidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
Kloridrat tal-prometazina	58-33-3	Amina/Amidina, Eteroċikliku, Kompost tal-kubrit organiku	Solidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
Idrossidu tas-sodju (10 %)	1310-73-2	Alkali	Likwidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
Sulfat lauril tas-sodju (15 %)	151-21-3	Aċidu karbossiliku (melh)	Likwidu	Kategorija 1	Korrużivi/ Irritanti Severi
4-karbossi-benzaldeid	619-66-9	Aċidu karbossiliku, Aldeid	Solidu	Kategorija 2(A)	Mhux korrużivi/ Irritanti mhux severi
Nitrat tal-ammonju	6484-52-2	Melh inorganiku	Solidu	Kategorija 2(A)	Mhux korrużivi/ Irritanti mhux severi
Etil-2-metilacetato-āċetat	609-14-3	Keton, Ester	Likwidu	Kategorija 2(B)	Mhux korrużivi/ Irritanti mhux severi
Gliċerol	56-81-5	Alkohol	Likwidu	Ebda Kategorija	Mhux korrużivi/ Irritanti mhux severi

Taqsiriet: Nru CAS = Numru tar-Reġistru tal-Chemical Abstracts Service

⁽¹⁾ Klassijiet tas-sustanzi kimiċi ġew assenjati lil kull sustanza kimika tat-test li tuza skema ta' klassifikazzjoni standard, fuq il-bażi tas-sistema ta' klassifikazzjoni tal-Librerija Nazzjonali tal-Intestaturi tas-Suġġetti Mediċi tal-Mediċina (MeSH) (disponibbli fuq <http://www.nlm.nih.gov/mesh>)

⁽²⁾ Abbażi tar-riżultati mit-test *in vivo* fuq għajnejn il-fniek (OECD TG 405, TM B.5) u bl-użu tal-GHS tan-NU u s-CLP tal-UE.

⁽³⁾ Abbażi tar-riżultati miksubin bl-FL (Protokoll INVITTOX Nru 71)

▼ M7

B.62. ASSAĠĠ *IN VIVO* KOMETA TAL-ALKALINI TAL-MAMMIFERI**INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 489 tal-OECD (2016). L-assaġġ kometa alkalini *in vivo* (tal-elettroforezi b'gell ta' ċellola waħda) (minn hawn 'il quddiem imsejjah sempliċiment l-assaġġ kometa) jintuża għall-identifikazzjoni ta' ksur fil-hajta tad-DNA f'ċelloli jew nukleji iżolati minn diversi tessuti tal-annimali, normalment roditori, li ġew esposti għal materjal(i) potenzjalment ġenotossiku. L-assaġġ kometa ġie rivedut u ġew ippubblikati rakkomandazzjonijiet minn bosta gruppi ta' esperti (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa parti minn sensiela ta' metodi ta' ttestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika. Ġie żviluppat dokument tal-OECD li jipprovdi informazzjoni sintetika dwar l-ittestjar dwar it-tossikoloġija ġenetika u harsa ġenerali dwar it-tibdil reċenti la sar f'dawk il-Linji Gwida tat-Test (11).

L-iskop tal-assaġġ kometa huwa li jidentifika sustanzi kimiċi li jikkawgħaw hsara fid-DNA. F'kundizzjonijiet alkalini (> pH 13), l-assaġġ kometa jista' jidentifika hsara f'hajta waħda u fit-tnejn, li tirriżulta, pereżempju, minn interazzjonijiet diretti mad-DNA, siti alkali li jinbidlu jew bħala konsegwenza ta' hsarat tranżjenti fil-hjut tad-DNA li jirriżultaw minn tiswija ta' qtugħ tad-DNA. Dawn il-hsarat fil-hjut jistgħu jissewew, b'tali mod li ma jwassalx għal effett persistenti, jistgħu jkunu letali għaċ-ċellola, jew jistgħu jissewew f'mutazzjoni li tirriżulta f'bidla vijabbli permanenti. Jistgħu jwasslu wkoll għal hsara fil-kromożomi li hija assoċjata wkoll ma' hafna mardiet tal-bniedem, inkluż il-kanċer.

Prova ta' validazzjoni formali tal-assaġġ kometa *in vivo* fir-roditori sar fl-2006-2012, koordinat miċ-Ċentru Ġappuniż għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (JaCVAM), flimkien maċ-Ċentru Ewropew għall-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ECVAM), il-Kumitat ta' Koordinazzjoni Interagenzjali dwar il-Validazzjoni ta' Metodi Alternattivi (ICCVAM), u ċ-Ċentru Interagenzjali tal-NTP għall-Evalwazzjoni ta' Metodi Tossikoloġiċi Alternattivi (NICEATM) (12). Dan il-metodu ta' ttestjar jinkludi l-użu rakkomandat u l-limitazzjonijiet tal-assaġġ kometa, u huwa bbażat fuq il-protokoll finali (12) użat fil-prova ta' validazzjoni, u fuq dejta (proprietarja tal-laboratorji) addizzjonali rilevanti ppubblikata u mhux ippubblikata.

Id-definizzjonijiet tat-termini ewlenin huma stabbiliti fl-Appendiċi 1. Huwa osservat li jistgħu jintużaw hafna pjattaformi differenti għal dan l-assaġġ (lametti tal-mikroskopju, ponot tal-gell, pjastri b'96 bwejra, eċċ.). Għall-konvenjenza, it-terminu "lametta" jintuża fil-bqija ta' dan id-dokument iżda jkopri l-pjattaformi kollha l-oħrajn.

KUNSIDERAZZJONIJIET U LIMITAZZJONIJIET INIZJALI

L-assaġġ kometa huwa metodu għall-kejl tal-hsarat fil-hjut tad-DNA f'ċelloli ewkarjotiċi. Ċelloli individwali/nukleji inkorporati f'agarożju fuq lametta jiġu lizati b'deterġent u konċentrazzjoni għolja ta' melh. Dan l-istadju tal-lizi jiddigesti l-membrani ċellolari u nukleari u jippermetti r-rilaxx tal-loops tad-DNA koljati li ġeneralment jissejju nukleojdi u frammenti tad-DNA. L-elettroforezi f'riżultati għoljin tal-pH fi strutturi li jixbhu kometi, li, meta jintuża tilwin fluworexxenti, jistgħu jiġu osservati bil-mikroskopija tal-fluworexxenza; il-frammenti tad-DNA jitbiegħdu mir-"ras" lejn id-"denb" fuq il-bażi tal-qies tagħhom, u l-intensità tad-denb tal-kometa b'rabta mal-intensità totali (ras flimkien mad-denb) tirrifletti l-ammont ta' hsara fid-DNA (13) (14) (15).

L-assaġġ kometa alkalini *in vivo* huwa ta' rilevanza partikolari għall-valutazzjoni tal-periklu ġenotossiku peress li r-rispons tal-assaġġ jiddependu mill-ADME *in vivo* (assorbiment, distribuzzjoni, metabolizmu u eskrezzjoni), kif ukoll mill-proċessi ta' tiswija tad-DNA. Dawn jistgħu jvarjaw bejn speċi u oħra, tessuti u iehor u bejn it-tipi ta' hsarat tad-DNA.

▼ M7

Sabiex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti ta' trattament xieraq tal-annimali, b'mod partikolari t-tnaqqis fl-użu ta' annimali (bl-Ingliż imsejnhin “3Rs — Replacement, Reduction, Refinement— principles” il-prinċipji ta' Sostituzzjoni, Tnaqqis u Rfinar), dan l-assaġġ jista' jiġi integrat ukoll ma' studji tossikoloġiċi oħrajn, eż. studji tat-tossicità b'doża ripetuta (10) (16) (17), jew il-punt ta' tmiem jista' jiġi kombinat ma' punti ta' tmiem oħrajn tal-ġenotossicità bħall-assaġġ tal-mikro-nukleu tal-eritroċiti tal-mammiferi *in vivo* (18) (19) (20). L-assaġġ kometa jsir l-iktar f'roditori, għad li ġie applikat għal speċijiet mammiferi u mhux mammiferi oħrajn. L-użu ta' speċijiet mhux roditori għandu jkun iġġustifikat b'mod xjentifiku u etiku fuq il-bażi ta' każ b'każ u huwa tassew rakkomandat li l-assaġġ kometa jsir biss fuq speċijiet li mhumiex roditori bħala parti minn studju ieħor tat-tossicità, u mhux bħala test wahdu.

L-għażla tar-rotta tal-esponiment u t-tessut(i) li se jrin jiġu studjati għandha ssir fuq il-bażi tal-għarfien disponibbli/ezistenti kollu dwar is-sustanzi kimiċi tat-test, eż. ir-rotta maħsuba/mistennija tal-esponiment tal-bniedem, il-metabolizmu u d-distribuzzjoni, il-potenzjal għal effetti fis-sit ta' kuntatt, it-twissijiet strutturali, dejta oħra dwar il-ġenotossicità jew it-tossicità, u l-iskop tal-istudju. B'hekk, fejn xieraq, il-potenzjal ġenotossiku tas-sustanzi kimiċi tat-test jista' jiġi vvalutat fit-tessut(i) fil-mira ta' effetti karċinoġeniċi u/jew tossiċi oħrajn. L-assaġġ huwa kkunsidrat siewi wkoll sabiex tkun tista' ssir investigazzjoni ulterjuri tal-ġenotossicità żvelata minn sistema *in vitro*. Xieraq li jsir assaġġ kometa *in vivo* f'tessut ta' interess meta jista' jkun raġonevolment mistenni li t-tessut ta' interess se jjer ikun espost b'mod adegwat.

L-assaġġ ġie vvalidat bl-iktar mod estensiv f'tessuti somatiċi ta' firien irġiel fi studji kollaborattivi bħall-prova tal-JaCVAM (12) u f'Rothfuss *et al.*, 2010 (10). Fil-prova ta' validazzjoni internazzjonali tal-JaCVAM intużaw il-fwied u l-istonku. Il-fwied, għaliex huwa l-iktar organu attiv fil-metabolizmu tas-sustanzi kimiċi u spiss organiku fil-mira għall-karċinoġeniċità wkoll. L-istonku, għaliex normalment ikun l-ewwel sit ta' kuntatt għas-sustanzi kimiċi wara esponiment orali, għad li żoni oħrajn tal-apparat gastrointestinali bħad-duodenu u l-geġunu għandhom jiġu kkunsidrati wkoll bħala tessuti tas-sit ta' kuntatt u jistgħu jitqiesu li huma iktar rilevanti għal bniedem mill-istonku glandulari tar-roditori. Wiehed għandu joqgħod attent li jiżgura li t-tali tessuti ma jkunux esposti għal konċentrazzjonijiet għoljin wisq tas-sustanzi kimiċi tat-test (21). Fil-prinċipju, it-teknika hija applikabbli għal kwalunkwe tessut li minnu jistgħu jinkisbu sospensjonijiet ta' ċellola wahda/nukleji. Id-dejta proprjetarja minn bosta laboratorji turi l-applikazzjoni b'suċċess tagħha għal hafna tessuti differenti, u hemm hafna pubblikazzjonijiet li juru l-applikabilità tat-teknika għal organi jew tessuti oħrajn apparti l-fwied u l-istonku, eż. il-geġunu (22), il-kilwa (23) (24), il-gilda (25) (26), jew il-borża tal-awrina (27) (28), il-fwied u ċ-ċelloli tal-ħasil bronkoalveolari (rilevanti għal studji tas-sustanzi kimiċi meħudin man-nifs) (29) (30), u saru testijiet f'bosta organi wkoll (31) (32).

Filwaqt li jista' jkun hemm interess f'effetti ġenotossici f'ċelloli ġerminali, ta' min jgħid li l-assaġġ kometa alkalini standard kif deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar ma jitqiesx li huwa xieraq sabiex jitkeġġu l-ħsarat fil-ħjut tad-DNA f'ċelloli ġerminali maturi. Peress li l-livelli ta' sfond varjabbli u għoljin fil-ħsara tad-DNA ġew irrapportati f'prezizzjoni tat-tagħrif fuq l-użu tal-assaġġ kometa għall-ġenotossicità taċ-ċelloli ġerminali (33), jitqies li huwa neċessarju li jsiru modifiki fil-protokoll flimkien ma' standardizzazzjoni aħjar u studji ta' validazzjoni qabel ma l-assaġġ kometa dwar iċ-ċelloli ġerminali maturi (eż. l-isperma) ikun jista' jiġi inkluz fil-metodu ta' ttestjar. Barra minn hekk, ir-regimen tal-esponiment rakkomandat f'dan il-metodu ta' ttestjar mhuwiex ottimali u jkun hemm bżonn ta' esponimenti itwal jew hinijiet tal-kampjunar itwal sabiex tkun tista' ssir analiżi sinifikanti tal-ħsarat fil-ħjut tad-DNA fi sperma matura. L-effetti ġenotossici kif imkeġġin mill-assaġġ kometa f'ċelloli testikolari fi stadji differenti tad-differenzazzjoni ġew deskritti fit-tagħrif (34) (35). Madankollu, ta' min jgħid li l-gonadi fihom tahlita ta' ċelloli somatiċi u ġerminali. Għalhekk, riżultati pożittivi fil-gonad shiħ (testikoli) mhux bilfors jirriflettew ħsara fiċ-ċellola ġerminali; minkejja dan, jindikaw li s-sustanza kimika (jew sustanzi kimiċi) ittestjata u/jew il-metaboliti tagħha laħqu l-gonad.

▼ M7

Retikolazzjonijiet ma jistgħux jiġu identifikati b'mod affidabbli fil-kundizzjonijiet sperimentali standard tal-assaġġ kometa. F'ċerti kundizzjonijiet sperimentali modifikati, jistgħu jiġu identifikati retikolazzjonijiet DNA-DNA u DNA-proteina, u modifiki bażi oħrajn bħal bażijiet ossidizzati (23) (36) (37) (38) (39). Iżda jkun hemm bżonn li ssir iktar hidma sabiex jiġu kkaratterizzati b'mod adegwat il-modifiki neċessarji fil-protokoll. B'hekk, l-identifikazzjoni ta' aġenti f'retikolazzjoni mhijiex l-iskop primarju tal-assaġġ kif deskritt hawnhekk. L-assaġġ mhuwiex adattat, lanqas b'modifiki, għall-identifikazzjoni ta' anewġeni.

Minhabba l-istat attwali tal-gharfien, bosta limitazzjonijiet oħrajn (ara l-Appendiċi 3) huma assoċjati mal-assaġġ kometa *in vivo*. Huwa mistenni li l-metodu ta' ttestjar sejjer jiġi rivedut fil-ġejjieni u, jekk hemm bżonn, rivedut fid-dawl tal-esperjenza miksuba.

Qabel ma jintuza dan il-metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-ġenerazzjoni ta' dejta għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex. Dawn il-kunsiderazzjonijiet ma jkunux mehtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.

PRINĊIPJU TAL-METODU

L-annimali huma esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' rotta xierqa. Deskrizzjoni dettaljata tad-dożaġġ u l-kampjunar hija mogħtija fil-paragrafi 36-40. Fil-hin(ijiet) tal-kampjunar magħżulin, it-tessuti ta' interess huma dissezżjonati u jithejjew is-sospensjonijiet taċ-ċelloli individwali/in-nukleji (tista' ssir perfużjoni *in situ* meta titqies siewja, eż. il-fwied) u jiġu inkorporati f'agar artab sabiex jiġu immobilizzati fuq lametti. Iċ-ċelloli/nukleji jiġu ttrattati b'bafer tal-lizi sabiex titneħħa l-membrana ċellolari u/jew nukleari, u jiġu esposti għal alkali b'saħħithom, eż. $\text{pH} \geq 13$ sabiex id-DNA jkun jista' jinħall u jiġu rilaxxati loops u frammenti tad-DNA rilassati. Imbagħad, id-DNA nukleari fl-agar jiġi soġġett għal elettroforezi. Il-molekoli tad-DNA mhux frammentati normali jibqgħu fil-pozizzjoni fejn kien id-DNA nukleari fl-agar, filwaqt li kwalunkwe loop tad-DNA frammentat u tad-DNA rilassat jimxu lejn l-anodu. Wara l-elettroforezi, id-DNA jiġi viżwalizzat bl-użu ta' tilwin fluworexxenti xieraq. Il-preparazzjonijiet għandhom jiġu analizzati bl-użu ta' mikroskopju u sistemi ta' analiżi tal-immaġnijiet awtomatizzati għalkollox jew semiautomatizzati. L-ammont ta' DNA li jimxi matul l-elettroforezi u d-distanza tal-mixi jirriflettu l-ammont u d-daqs tal-frammenti tad-DNA. Hemm bosta punti ta' tmiem għall-assaġġ kometa. Il-kontenut ta' DNA fid-denb (% tad-DNA tad-dnieb jew % tal-intensità tad-dnieb) ġie rakkomandat sabiex tiġi vvalutata l-ħsara fid-DNA (12) (40) (41) (42). Wara li jiġi analizzat numru biżżejjed ta' nukleji, id-dejta tiġi analizzata b'metodi xierqa sabiex jiġu ġġudikati r-riżultati tal-assaġġ.

Ta' min jinnota li l-alterazzjoni ta' bosta aspetti tal-metodoloġija, inklużi t-thejjija tal-kampjuni, il-kundizzjonijiet tal-elettroforezi, il-parametri tal-analiżi viżwali (eż. l-intensità tat-tilwin, l-intensità tad-dawl mill-bozza tal-mikroskopju, u l-użu ta' filtri tal-mikroskopju u dinamiki tal-kamera) u l-kundizzjonijiet ambjentali (eż. dawl ta' sfond), ġew investigati u jistgħu jaffettwaw il-mixi tad-DNA (43) (44) (45) (46).

VERIFIKA TAL-PROFIĊJENZA TAL-LABORATORJU

Kull laboratorju għandu jistabbilixxi kompetenza sperimentali fl-assaġġ kometa billi juri l-hila li jikseb sospensjonijiet ta' ċelloli individwali jew nukleji ta' kwalità għolja biżżejjed għal kull tessut(i) fil-mira għal kull speċi uzata. Il-kwalità tal-preparazzjonijiet sejjra tiġi evalwata l-ewwel mill- % tad-DNA tad-dnieb għall-annimali ttrattati bil-veikolu li jaqgħu fi hdan medda baxxa riproduttibbli. Id-dejta attwali tissugġerixxi li l- % medju tad-DNA tad-dnieb tal-grupp (fuq il-baži tal-medja tal-medjani — ara l-paragrafu 57 għal dettalji dwar dawn it-termini) fil-fwied tal-firien idealment ma għandux jaqbeż is-6 %, li jkun konsistenti mal-valuri fil-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (12) u minn dejta ppubblikata u proprjetarja oħra. Ma hemmx biżżejjed dejta għalissa sabiex issir rakkomandazzjoni dwar il-meded ottimali jew aċċettabbli għal tessuti oħrajn. Dan ma

▼ **M7**

jipprekludix l-użu ta' tessuti oħrajn, jekk dan ikun iġġustifikat. Ir-rapport tat-test għandu jipprovi revizjoni xierqa tat-tweġġ tal-assaġġ kometa f'dawk it-tessuti b'rabta mat-tagħrif ippubblikat jew minn dejta proprjetarja. L-ewwel nett, medda baxxa ta' % tad-DNA tad-dnieb hija l-ideali sabiex tiġi pprovduta meda dinamika bizzejjed halli jiġi identifikat effett pożittiv. It-tieni, kull laboratorju għandu jkun kapaċi jirriproduċi r-risponsi mistennijin għal mutageni diretti u promutageni, b'modi ta' azzjoni differenti kif issuġġerit fit-Tabella 1 (paragrafu 29).

Jistgħu jintgħazlu sustanzi pożittivi, pereżempju mill-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (12) jew minn dejta ppubblikata oħra (ara l-paragrafu 9), jekk xieraq, b'ġustifikazzjoni, u billi jintwerew risponsi ċari u pożittivi fit-tessuti ta' interess. Il-hila li jiġu identifikati effetti dgħajfin ta' mutageni magħrufin eż. EMS f'dożi baxxi, għandha tintwera wkoll, pereżempju billi jiġu stabbiliti relazzjonijiet bejn id-doża u r-rispons b'numri u spazjar xierqa tad-dożi. L-isforzi inizjali għandhom jiffokaw fuq l-istabbiliment tal-proficjenza bl-iktar tessuti użati spiss, eż. fwied tar-roditori, meta jkun jista' jsir paragun mad-dejta eżistenti u r-riżultati mistennijin (12). Fl-istess hin tista' tingabar dejta minn tessuti oħrajn, eż. l-istonku/id-duwodenu/il-ġegunu, id-demm, eċċ. Il-laboratorju jrid juri l-proficjenza b'kull tessut individwali f'kull speċi li bihsiebu jistudja, u sejjer ikollu b'żonn juri li jista' jinkiseb rispons pożittiv aċċettabbli b'mutagenu magħruf (eż. EMS) f'dak it-tessut.

Id-dejta tal-kontroll tal-veikolu/negattiv għandha tingabar sabiex tintwera r-riproduċibbiltà tar-risponsi tad-dejta negattivi, u sabiex jiġi żgurat li l-aspetti tekniċi tal-assaġġ kienu kkontrollati kif xieraq jew sabiex jiġi ssuġġerit il-b'żonn li jergħu jiġu stabbiliti l-meded storiċi tal-kontroll (ara l-paragrafu 22).

Ta' min jinnota li, filwaqt li jistgħu jingabru bosta tessuti matul in-nekropsija u dawn jistgħu jiġu pproċessati għall-analiżi kometa, il-laboratorju jrid ikun proficjenti fil-ġbir ta' bosta tessuti minn annimal wiehied, u b'hekk jiġi żgurat li kwalunkwe leżjoni tad-DNA ma tintilifx u l-analiżi kometa ma tkunx f'riskju. It-tul ta' żmien mill-ewtanażja sat-tneħħija tat-tessuti għall-ipproċessar jista' jkun kritiku (ara l-paragrafu 44).

It-trattament xieraq tal-annimali jrid jiġi kkunsidrat filwaqt li tiġi żviluppata l-proficjenza f'dan it-test u, għalhekk, it-tessuti minn annimali użati f'testijiet oħrajn jistgħu jintużaw meta tiġi żviluppata l-kompetenza fil-bosta aspetti tat-test. Barra minn hekk, jaf ma jkunx hemm b'żonn li jsir studju shiħ matul l-istadji tal-istabbiliment ta' metodu ġdid ta' ttestjar fl-laboratorju u jistgħu jintużaw inqas annimali jew konċentrazzjonijiet tat-test meta jiġu żviluppati l-hiliet meħtieġa.

Dejta storika tal-kontroll

Matul l-investigazzjonijiet tal-proficjenza, il-laboratorju għandu jibni database storika sabiex jistabbilixxi l-meded tal-kontroll pożittiv u negattiv u d-distribuzzjonijiet għat-tessuti u l-ispeċijiet rilevanti. Rakkomandazzjonijiet dwar kif jibnu u jużaw id-dejta storika (jiġifieri kriterji għall-inkluzjoni u l-eskluzjoni ta' dejta fid-dejta storika u l-kriterji ta' aċċettabbiltà għal esperiment partikolari) jistgħu jinkisbu mit-tagħrif (47). Tessuti u speċijiet differenti, kif ukoll veikoli u rotot tal-amministrazzjoni differenti, jistgħu jrendu valuri tal- % tad-DNA tad-dnieb tal-kontroll negattiv differenti. Għaldaqstant, huwa importanti li jiġu stabbiliti meded tal-kontroll negattiv għal kull tessut u speċi. Il-laboratorji għandhom jużaw metodi ta' kontroll tal-kwalità, bħal karti tal-kontroll (eż. C-charts jew

▼ **M7**

X-bar charts (48)), sabiex jidentifikaw kemm hija varjabbli d-dejta tagħhom, u sabiex juru li l-metodoloġija hija "taħt kontroll" fil-laboratorju tagħhom. L-ghażla ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv, il-meded tad-dożi u l-kundizzjonijiet sperimentali xierqa (eż. il-kundizzjonijiet tal-elettroforezi) jaf ikollha bżonn tiġi ottimizzata wkoll għall-identifikazzjoni ta' effetti dgħajfin (ara l-paragrafu 17).

Kwalunkwe bidla fil-protokoll tal-esperimenti għandha tiġi kkunsidrata fid-dawl tal-konsistenza tagħha mad-databases tal-kontroll storiċi eżistenti tal-laboratorju. Kwalunkwe inkonsistenza kbira għandha tirriżulta fl-istabbiliment ta' database storika ġdida tal-kontroll.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Preparamenti***Għażla ta' speċi tal-annimali*

Normalment jintużaw razze tal-laboratorju komuni ta' rodituri adulti żgħar b'saħ-hithom (età ta' 6-10 ġimgħat fil-bidu tat-trattament, għad li jistgħu jiġu aċċettati annimali ftit ixaħ ukoll). L-ghażla tal-ispeċi ta' rodituri għandha tkun ibbażata fuq (i) speċijiet użati fi studji tat-tossicità oħrajn (li jridu jkunu kapaci jikkorre-lataw dejta u jippermettu li jsiru studji integrati), (ii) speċijiet li żviluppaw tumuri fi studju tal-karċinoġenicità (meta ġie investigat il-mekkanizmu tal-karċinoġe-nesi), jew (iii) speċijiet l-iktar metabolizmu rilevanti għall-bniedem, jekk magħ-rufin. F'dan it-test spiss jintużaw il-firien. Madankollu, jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn jekk ikunu etikament u xjentifikament iġġustifikati.

Kundizzjonijiet tal-abitazzjoni u l-għalf tal-annimali

Għar-rodituri, idealment, it-temperatura fil-kamra tal-annimali sperimentali għandha tkun ta' 22 °C ($\pm$ 3 °C). Idealment, l-umdità relattiva għandha tkun ta' 50-60 %, u tal-inqas 30 % u, idealment, ma taqbiżx is-70 % hlief matul it-tindif tal-kamra. Id-dawl għandu jkun artifiċjali, b'sekwenza ta' 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam. Dwar l-għalf, jistgħu jintużaw dieti konvenzjonali tal-labora-torju bi provvista bla limitu ta' ilma tax-xorb. L-ghażla tad-dieta tista' tkun influwenzata mill-bżonn li tiġi żgurata tahlita xierqa ta' sustanza kimika tat-test meta tingħata minn din ir-rotta. Ir-rodituri għandhom jitrabbew fi gruppi żgħar (normalment mhux iktar minn hamsa) tal-istess sess jekk ma tkun mistennija ebda mġiba aggressiva. L-annimali jistgħu jitrabbew wahedhom biss jekk dan ikollu ġustifikazzjoni xjentifika. Art solida għandha tintuża kull meta jkun possibbli għaliex art tal-gradilji tista' tikkawża korrimenti serji (49). Irid jiġi pprovdut arrikkiment xieraq tal-bejta.

Preparazzjoni tal-annimali

L-annimali jiġu assenjati b'mod każwali lill-gruppi tal-kontroll u tat-trattament. L-annimali jiġu identifikati b'mod uniku u jiġihallaw iderru fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju għal tal-inqas hamest ijiem qabel ma jibda t-trattament. Irid jintuża l-inqas metodu invaziv ta' identifikazzjoni b'mod uniku tal-annimali. Metodi xierqa jinkludu ċrieki, tikketti, mikroċipep u identifikazzjoni bijometrika. Il-qtugħ tas-swaba' u tal-widnejn mhuwiex xjentifikament iġġustifikat f'dawn it-testijiet. Il-gaġeġ għandhom ikunu rranġati b'mod li jkunu mminimizzati l-effetti possibbli minhabba t-tqegħid tal-gaġeġ. Fil-bidu tal-istudju, il-varjazzjoni fil-piż tal-anni-mali għandha tkun minima u ma taqbiżx $\pm$ 20 %.

Preparazzjoni tad-dożi

Is-sustanzi kimiċi solidi tat-test għandhom jinħallu jew jiġu sospizi f'veikoli xierqa jew jiġihallu f'dieta jew ilma tajjeb għax-xorb qabel id-dożaġġ tal-annimali. Is-sustanzi kimiċi likwidi tat-test jistgħu jiġu dożati direttament jew jiġu dilwiti qabel id-dożaġġ. Għal esponiment bit-tehid man-nifs, is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw bhala gass, fwar jew aerosol solidu/likwidu, skont il-proprjeta-jiet fizikokimiċi tagħhom (50) (51).

Għandhom jintużaw preparati godda tas-sustanza kimika tat-test sakemm id-dejta dwar l-istabilità ma turix l-aċċettabilità tal-ħżin u tiddefinixxi l-kundizzjonijiet tal-ħżin xierqa.

▼ **M7****Kundizzjonijiet tat-test***Il-veikolu*

Il-veikolu ma għandhomx jipproduċu effetti tossiċi fil-volumi tad-doża użati, u ma għandhomx ikunu ssuspettati b'reazzjoni kimika mas-sustanzi kimiċi tat-test. Jekk jintużaw veikoli oħrajn li mhumiex magħrufin sew, l-inkluzjoni tagħhom għandha tkun sostnuta permezz ta' dejta ta' referenza li tindika l-kompatibbiltà tagħhom f'termini tal-annimali tat-test, ir-rotta tal-amministrazzjoni u l-punt ta' tmim. Huwa rakkomandat li, fejn jista' jkun, l-ewwel jiġi kkunsidrat l-użu ta' solvent/veikolu milwiem. Ta' min jgħid li ċerti veikoli (speċjalment veikoli viskużi) jistgħu jinduċu infjammazzjoni u jżidu l-livelli ta' sfond tal-ħsarat fil-ħjut tad-DNA fis-sit ta' kuntatt, speċjalment b'amministrazzjonijiet multipli.

Kontrolli*Kontrolli pożittivi*

Bħalissa, ma' kull test normalment għandhom ikunu inkluzi tal-inqas 3 annimali analizzabbli ta' sess wiehed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn (ara l-paragrafu 32), ittrattati b'sustanza tal-kontroll pożittiv. Fil-gejjieni, jaf'ikun possibbli li tintwera profiċjenza adegwata sabiex jonqos il-bżonn ta' kontrolli pożittivi. Jekk jintużaw bosta hinijiet tal-kampjunar (eż. bi protokoll tal-amministrazzjoni wiehed), hemm bżonn li jkun inklużi biss kontrolli pożittivi f'wiehed mill-hinijiet tal-kampjunar, iżda għandu jkun żgurat disinn ibbilanċjat (ara l-paragrafu 48). Ma hemmx bżonn li jiġu amministrati sustanzi tal-kontroll pożittiv parallel mill-istess rotta bħas-sustanza kimika tat-test, għad li huwa importanti li tintuża l-istess rotta meta jitkejlu l-effetti fis-sit ta' kuntatt. Is-sustanzi kimiċi tal-kontroll pożittiv għandhom ikunu murijin li jinduċu ħsarat fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti ta' interess kollha għas-sustanza kimika tat-test, u EMS aktarx li jkun il-kontroll pożittiv tal-ghażla peress li pproduċa ħsarat fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti kollha li ġew studjati. Id-dozi tas-sustanzi tal-kontroll pożittiv għandhom jintgħażlu sabiex jipproduċu effetti moderati li jivvalutaw b'mod kritiku l-prestazzjoni u s-sensittività tal-assaġġ u jistgħu jkun bbażati fuq il-kurvi ta' doża — rispons stabbilita mil-laboratorju matul il-wiri tal-profiċjenza. Il- % tad-DNA tad-dnieb fl-annimali tal-kontroll pożittiv parallel għandu jkun konsistenti mal-medda tal-laboratorju prestabbilita għal kull tessut individwali u hin tal-kampjunar għal dik l-ispeċi (ara l-paragrafu 16). Fit-Tabella 1 hemm inkluzi eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv u uħud mit-tessuti fil-mira (f'roduri) tagħhom. Jistgħu jintgħażlu sustanzi li mhumiex fost daww mogħtijin fit-Tabella 1 jekk ikunu ġġustifikati xjentifikament.

*Tabella 1***Eżempji ta' sustanzi tal-kontroll pożittiv u uħud mit-tessuti fil-mira tagħhom**

Sustanzi u Nru RN tas-CAS
Etil metansulfonat (RN tas-CAS 62-50-0) għal kwalunkwe tessut
Etil nitrosurea (RN tas-CAS 759-73-9) għal fwied u stonku, duwodenu jew ġegunu
Metil metansulfonat (RN tas-CAS 66-27-3) għal fwied, stonku, duwodenu jew ġegunu, fwied u ċelloli tal-ħasil bronkoalveolari (BAL), kilwa, bużżieqa tal-awrina, pulmun, testikoli u mudullun tal-ghadam/demm
N-Metil-N'-nitro-N-nitrosogwanidina (RN tas-CAS: 70-25-7) għal stonku, duwodenu jew ġegunu
1,2-Dimetilidrażina 2HCl (RN tas-CAS 306-37-6) għal fwied u intestin
N-metil-N-nitrosurea (RN tas-CAS 684-93-5) għal fwied, mudullun tal-ghadam, demm, kilwa, stonku, ġegunu u mohħ.

▼ **M7***Kontrolli negattivi*

Grupp ta' annimali tal-kontroll negattiv, ittrattati b'veikolu wahdu, u fil-bqija ttrattati bl-istess mod bhall-gruppi tat-trattament, għandu jkun inkluż ma' kull test għal kull hin tal-kampjunar u tessut. Il- % tad-DNA tad-dnieb fl-annimali tal-kontroll negattiv għandu jkun fi hdan il-medda prestabbilita ta' sfond tal-laboratorju għal kull tessut individwali u hin tal-kampjunar għal dik l-ispeċi (ara l-paragrafu 16). Fin-nuqqas ta' dejta storika jew ippubblikata tal-kontroll li turi li ma huwa indott ebda effett dannuż jew ġenotossiku mill-veikolu magħżul, min-numru ta' amministrazzjonijiet jew mir-rotta tal-amministrazzjoni, l-istudji inizjali għandhom isiru qabel ma jsir l-istudju shih, sabiex tiġi stabbilita l-aċċettabilità tal-kontroll tal-veikolu.

PROCEDURA**In-numru u s-sess tal-annimali**

Għad li f'tit li xejn hemm dejta fuq annimali nisa li minnhom jista' jsir paragon bejn is-sessi b'rabta mal-assaġġ kometa, b'mod ġenerali, risponsi tal-ġenotossicità *in vivo* oħrajn huma simili bejn annimali rġiel u annimali nisa u, għalhekk, hafna mill-istudji jistgħu jsiru f'kull sess. Dejta li turi d-differenzi rilevanti bejn l-irġiel u n-nisa (eż. differenzi fit-tossicità sistemika, il-metabolizmu, il-bijodisponibilità, eċċ. inkluż, eż. fi studju għat-tiftix tal-medda) thegħġegħ l-użu taż-żewġ sessi. F'dan il-każ, jaf ikun xieraq li jsir studju fiż-żewġ sessi, eż. bħala parti minn studju ripetut tat-tossicità tad-doża. Jaf ikun xieraq li jintuża d-disinn fattorjali f'każ li jintużaw iż-żewġ sessi. Dettalji dwar kif tiġi analizzata d-dejta bl-użu ta' dan id-disinn huma mogħtijin fl-Appendiċi 2.

Id-daqsijiet tal-grupp fil-bidu tal-istudju (u matul l-istabbiliment tal-profiċjenza) għandhom jiġu stabbiliti bil-ghan li jiġu pprovduti tal-inqas 5 annimali analizzabbli ta' sess wiehed, jew ta' kull sess jekk jintużaw it-tnejn, għal kull grupp (inqas fil-grupp tal-kontroll pożittiv parallel — ara l-paragrafu 29). Fejn l-esponent umana għas-sustanzi kimiċi tista' tkun speċifika għas-sess, bħal ma jsehh pereżempju għal ċerti prodotti farmaċewtiċi, it-test għandu jsir b'annimali tas-sess xieraq. Bħala gwida għal rekwiżiti tipiċi massimi tal-annimali, studju mwettaq skont il-parametri stabbiliti fil-paragrafu 33 bi tliet gruppi tad-doża u kontrolli negattivi u pożittivi paralleli (kull grupp imsawwar minn hames annimali ta' sess uniku), ikun jehtieg bejn 25 u 35 animal.

SKEDA TAT-TRATTAMENT

L-annimali għandhom jingħataw trattamenti kuljum għal jumejn jew iktar (jiġi-fieri żewġ trattamenti jew iktar f'intervalli ta' madwar 24 siegħa), u l-kampjuni għandhom jingħabru darba sagħtejn sa sitt sigħat (jew fit- T_{max}) wara l-aħħar trattament (12). Kampjuni minn reġimi tad-doża estiżi (eż. dożaġġ kuljum għal 28 jum) jistgħu jiġu aċċettati. Intwriet b'suċċess it-tahlita tal-analiżi tal-kometa u t-test tal-mikronuklei tal-eritroċiti (10) (19). Madankollu, trid tingħata kunsiderazzjoni bir-reqqa lil-logistika involuta fil-kampjunar tat-tessuti għall-analiżi tal-kometa flimkien mar-rekwiżiti tal-kampjunar tat-tessut għal tipi oħrajn ta' valutazzjonijiet tossikoloġiċi. F'hafna kazijiet, il-gbir 24 siegħa wara l-aħħar doża, li huwa tipiku għal studju tat-tossicità ġenerali, mhuwiex adattat (ara l-paragrafu 40 dwar il-hin tal-kampjunar). L-użu ta' skedi tat-trattament u tal-kampjunar oħrajn għandu jkun iġġustifikat (ara l-Appendiċi 3). Pereżempju, trattament wiehed b'kampjunar multiplu jista' jintuża, iżda ta' min jgħid li dan ikun jehtieg iktar annimali għal studju b'amministrazzjoni wahda minhabba l-bżonn ta' bosta drabi tal-kampjunar, iżda kultant dan jista' jkun aħjar, eż. meta s-sustanza kimika tat-test tinduċi tossicità eċċessiva wara amministrazzjonijiet ripetuti.

▼ **M7**

Isir kif isir it-test, jista' jiġi aċċettat diment li s-sustanza kimika tat-test taghti rispons pożittiv jew, għal studju negattiv, diment li tkun inghatat l-evidenza diretta jew indiretta li ssostni l-esponiment ta', jew it-tossicità għat-tessut(i) fil-mira jew jekk tinkiseb id-doża limitu (ara l-paragrafu 36).

Is-sustanzi kimiċi tat-test jistgħu jingħataw ukoll bħala doża maqsuma, jiġifieri żewġ trattamenti fl-istess ġurnata separati b'mhux iktar minn sagħtejn jew tlieta) sabiex jiġi ffaċilitat l-ghoti ta' volum kbir. F'dawn iċ-ċirkustanzi, il-hin tal-kampjunar għandu jiġi skedat fuq il-bażi tal-hin tal-ahħar dożaġġ (ara l-paragrafu 40).

Livelli tad-doża

Jekk isir studju preliminari għat-tiftix tal-medda għaliex ma jkun hemm ebda dejta xierqa disponibbli minn studji rilevanti oħrajn sabiex tgħin fl-għażla tad-doża, dan għandu jsir fl-istess laboratorju, bl-użu tal-istess speċijiet, razza, sess u reġim tat-trattament li jrid jintuża fl-istudju ewlieni skont l-approċċi attwali għat-twettiq ta' studji ta' individwazzjoni tad-doża. L-istudju għandu jkollu l-għan li jidentifika d-doża massima tollerata (MTD), definita bħala d-doża li tinduċi effetti tossiċi hġief b'rabta mad-durata tal-perjodu ta' studju (pereżempju, sinjali kliniċi ċari bħal imġiba jew reazzjonijiet anormali, dipressjoni minuri tal-piż tal-ġisem jew ċitotossicità tat-tessut fil-mira), iżda mhux mewt jew evidenza ta' uġigh, tbatija jew diffikultà li tirrekjedi l-ewtanażja. Għal sustanza kimika tat-test mhux tossika, b'perjodu ta' amministrazzjoni ta' 14-il jum jew iktar, id-doża (limitu) massima hija ta' 1 000 mg/kg piż tal-ġisem/jum. Għal perjodi ta' għoti ta' 14-il jum jew inqas, id-doża (limitu) massimu hija ta' 2 000 mg/kg/piż tal-ġisem/jum. Għal ċerti tipi ta' sustanzi kimiċi tat-test (eż. prodotti farmaċewtiċi għall-bniedem) koperti minn regolamenti speċifiċi, dawn il-limiti jistgħu jvarjaw.

Sustanzi kimiċi li jesibixxu saturazzjoni tal-proprietajiet tossikokinetiċi, jew jinduċu proċessi ta' ditossifikazzjoni li jistgħu jwasslu għal tnaqqis fl-esponiment wara għoti fit-tul jistgħu jkunu eċċezzjonijiet għall-kriterji ta' ssettjar tad-doži u għandhom jiġu evalwati fuq bażi ta' każ b'każ.

Kemm għal verżjonijiet akuti kif ukoll dawk sottoakuti tal-assaġġ kometa, minbarra d-doża massima (MTD, doża massima fattibbli, esponiment massimu jew doża limitu), għandha tingħażel sekwenza dioxendenti ta' tal-inqas żewġ livelli tad-doża addizzjonali differenti biżżejjed (idealment separati b'inqas minn 10) għal din tal-kampjunar sabiex jintwerew ir-risponsi relatati mad-doża. Madankollu, il-livelli tad-doża użati idealment għandhom ikopru wkoll medda mill-massimu sa doża li tipproduċi ftit tossicità jew ebda tossicità. Meta tiġi osservata tossicità tat-tessut fil-mira fil-livelli tad-doża kollha ttestjati, huwa rakkomandat li jsir studju ulterjuri f'doži mhux tossiċi (ara l-paragrafi 54-55). Studji li jkollhom l-għan li jinvestigaw iktar bis-shih il-forma tal-kurva ta' doża — rispons jistgħu jehtieġu grupp(i) tad-doża addizzjonali.

Amministrazzjoni tad-Doži

Ir-rotta antiċipata tal-esponiment tal-bniedem għandha tiġi kkunsidrata meta jitfassal assaġġ. Għaldaqstant, jistgħu jingħazlu rotot tal-esponiment bħal rotta djetetika, mal-ilma tax-xorb, subkuntanja topika, fil-vini, orali (gavage), mat-tehid man-nifs, intratrakeali, jew b'impjant, kif iġġustifikati. Fi kwalunke każ, ir-rotta għandha tingħażel sabiex jiġi żgurat esponiment adegwat tat-tessut(i) fil-mira. Generalment ma tkunx rakkomandata injezzjoni intraperitoneali peress li mhijiex rotta tipikament rilevanti ta' esponiment tal-bniedem, u din għandha tintuża biss b'ġustifikazzjoni xjentifika speċifika (eż. ċerti sustanzi tal-kontroll pożittiv, għal

▼ M7

finijiet investigattivi, jew għal ċerti mediċini li jingħataw mir-rotta intraperitoneali). Il-volum massimu ta' likwidu li jista' jingħata b'gavage jew injezzjoni f'darba jiddependi mid-daqs tal-annimal tat-test. Il-volum m'għandux ikun aktar minn 1 ml/100 g tal-piż tal-ġisem hlief fil-każ ta' soluzzjonijiet fl-ilma fejn jistgħu jintużaw 2 ml/100g tal-piż tal-ġisem. L-użu ta' volumi ikbar minn dan (jekk ikunu permessi mil-legizlazzjoni dwar it-trattament xieraq tal-annimali) għandu jkun iġġustifikat. Kull meta jkun possibbli, għandhom jinkisbu livelli tad-doża differenti billi tiġi aġġustata l-koncentrazzjoni tal-formulazzjoni tad-dożaġġ sabiex jiġi volum kostanti b'rabta mal-piż tal-ġisem fil-livelli kollha tad-doża.

Hin tal-Kampjunar

Il-hin tal-kampjun huwa varjabbli kruċjali għaliex huwa stabbilit mill-perjodu mehtieg sabiex is-sustanzi kimiċi tat-test jilhqqu l-koncentrazzjoni massima fit-tessut fil-mira u sabiex jiġu indotti l-hsarat fil-hjut tad-DNA izda qabel ma jitilqu jew jisewwew dawn il-hsarat u qabel ma dawn iwasslu għall-mewt taċ-ċelloli. Il-persistenza ta' whud mil-leżjonijiet li jwasslu għall-hsarat fil-hjut tad-DNA identifikati mill-assaġġ kometa tista' tkun qasira hafna, tal-inqas għal uħud mis-sustanzi kimiċi ttestjati *in vitro* (52) (53). Għalhekk, jekk ikun hemm suspett ta' leżjonijiet tad-DNA trazjenti bħal dawn, għandhom jittiehdu miżuri sabiex jiġi mitigat it-telf tagħhom billi jiġi żgurat li jittiehed kampjun tat-tessuti minn kmieni, forsi qabel il-hinijiet prestabbiliti mogħtijin hawn taht. Il-hin(ijiet) tal-kampjunar ottimali jista' jkun speċifiku għas-sustanza kimika jew ir-rotta li tirriżulta, pereżempju, f'esponiment rapidu tat-tessut b'amministrazzjoni ġol-vina jew esponiment bit-tehid man-nifs. Għalhekk, meta tkun disponibbli, il-hinijiet tal-kampjunar għandhom ikunu stabbiliti minn dejta kinetika (eż. il-hin (T_{max}) li fih tinkiseb il-quċċata tal-plażma jew il-koncentrazzjoni fit-tessut (C_{max}), jew fl-istat stabbli għal amministrazzjonijiet multipli). Fin-nuqqas ta' dejta kinetika, kompromess xieraq għall-kejl tal-ġenotossicità huwa li jittiehed kampjun wara sagħtejn sa sitt sigħat mill-aħħar trattament għal zewġ trattamenti jew iktar, jew wara sagħtejn sa sitt sigħat u sittax sa sitta u ghoxrin siegħa wara amministrazzjoni waħda, għad li wiehed għandu joqgħod attent li ssir nekropsija lill-annimali kollha fl-istess hin wara l-aħħar (jew l-unika) doża. Tista' tintuża wkoll informazzjoni dwar id-dehra tal-effetti tossiċi fl-organi fil-mira (jekk disponibbli) sabiex jingħazlu l-iktar hinijiet tal-kampjunar xierqa.

Osservazzjonijiet

Għandhom isiru osservazzjonijiet kliniċi ġenerali marbutin mas-saħħa fuq l-annimali u dawn għandhom jiġu rreġistrati tal-inqas darba kuljum, idealment fl-istess hin(ijiet) kuljum u filwaqt li jiġi kkunsidrat il-perjodu ta' wara d-dożaġġ li fih sejin jidhru l-iktar l-effetti antiċipati (54). Tal-inqas darbtejn kuljum, l-annimali kollha għandhom ikunu osservati għal morbidità u mortalità. Għal studji b'durata itwal, l-annimali kollha għandhom jintiżnu tal-inqas darba fil-ġimgħa, u meta jispiċċa l-perjodu ta' ttestjar. Il-konsum tal-ikel għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ikel u tal-inqas darba fil-ġimgħa. Jekk is-sustanza kimika tat-test tingħata mal-ilma tax-xorb, il-konsum tal-ilma għandu jitkejjel f'kull bidla tal-ilma u tal-inqas darba fil-ġimgħa. L-annimali li jesibixxu indikaturi mhux letali ta' tossicità eċċessiva għandhom jiġu ewtanazzati qabel jintemm il-perjodu ta' ttestjar, u generalment ma jintużawx għall-analiżi kometa.

Ġbir tat-Tessuti

Peress li huwa possibbli li l-induzzjoni tal-hsarat fil-hjut tad-DNA (kometi) tiġi studjata prattikament fi kwalunkwe tessut, il-gustifikazzjoni għaliex intgħazel it-tessut(i) li jrid jingabar għandha tkun definita ċara u bbażata fuq ir-raġuni għat-twerttq tal-istudju flimkien ma' kwalunkwe dejta dwar l-ADME, il-ġenotossicità, il-karċinoġenicità jew dejta oħra dwar it-tossicità għas-sustanzi kimiċi tat-test investigati. Fatturi importanti x'jiġu kkunsidrati għandhom jinkludu r-rotta tal-amministrazzjoni (fuq il-baži tar-rotta (jew rotot) tal-esponiment probabbli tal-bniedem), id-distribuzzjoni u l-assorbiment tat-tessut imbassrin, ir-rwol tal-metabolizmu u l-mekkaniżmu possibbli ta' azzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test. Il-fwied kien l-iktar tessut studjat spiss u li fuqu hemm l-iktar dejta. Għaldaqstant, fin-nuqqas ta' kwalunkwe informazzjoni ta' sfond, u jekk ma jiġi identifikat ebda tessut speċifiku ta' interess, il-kampjunar tal-fwied ikun iġġustifikat peress li

▼ **M7**

dan huwa sit primarju ta' metabolizmu ksenobijotiku u spiss ikun espost hafna kemm ghal sustanza/sustanzi prinċipali kif ukoll metabolita/i. F'ċerti każijiet, l-eżaminazzjoni ta' sit ta' kuntatt dirett (pereżempju, għal sustanzi kimiċi mogħtijin oralment, l-istonku glandulari jew id-duwodenu/ġegunu, jew għal sustanzi kimiċi meħudin man-nifs, il-pulmun) tista' tkun l-iktar rilevanti. Għandhom jintgħazlu tessuti addizzjonali jew alternattivi fuq il-bażi tar-raġunijiet speċifiċi li għalihom qiegħed isir it-test iżda jista' jkun siewi li jiġu eżaminati bosta tessuti fl-istess annimali diment li l-laboratorju jkun wera li huwa profiċjenti b'dawk it-tessuti u kompetenti fl-immaniġġjar ta' bosta tessuti fl-istess hin.

Preparazzjoni tal-kampjuni

Għall-proċessi deskritti fil-paragrafi li ġejjin (44-49), importanti li s-soluzzjonijiet jew is-sospensjonijiet stabbli kollha jintużaw sad-data ta' skadenza tagħhom, jew inkella jiġu ppreparati għodda jekk ikun hemm bżonn. Anki fil-paragrafi li ġejjin, il-hinijiet meħudin sabiex (i) jitneħħa kull tessut wara n-nekropsija, (ii) jiġi pproċessat kull tessut f'sospensjonijiet taċ-ċelloli/nukleji, u (iii) tiġi pproċessata s-sospensjoni u jiġu ppreparati l-lametti koll jitqiesu varjabbli kritiċi (ara Definizzjonijiet, Appendiċi 1), u t-tul aċċettabbli ta' żmien għal kull wieħed minn dawn l-istadi għandu jkun ġie stabbilit matul it-tfassil tal-metodu u l-wiri tal-profiċjenza.

L-annimali sejrini jiġu ewtanazzati, b'mod konsistenti mal-legiżlazzjoni effettiva dwar it-trattament xieraq tal-annimali u l-prinċipji 3Rs, fil-hin(ijiet) xieraq wara l-aħħar trattament b'sustanza kimika tat-test. It-tessut(i) magħżul(jiet)neħħa, jiġi dissezżjonat, u sehem minnu jingabar għall-assaġġ kometa, filwaqt li fl-istess hin għandha tinqata' biċċa mill-istess parti tat-tessut u titqiegħed fis-soluzzjoni tal-formaldeid jew fissattiv xieraq għall-analiżi tal-istopatoloġija possibbli (ara l-paragrafu 55) skont il-metodi standard (12). It-tessut għall-assaġġ kometa jitqiegħed f'bafer tat-tqattigh, imlahlah biżżejjed b'bafer tat-tqattigh kiesah sabiex jitneħħa d-demmi residwi, u jinħażen f'bafer tat-tqattigh kiesah silġ sakemm jiġi pproċessat. Tista' ssir perfużjoni *in situ* wkoll, eż. għall-fwied, kilwa.

Jezistu hafna metodi ppubblikati għall-iżolament taċ-ċelloli/nuklei. Dawn jinkludu t-tqattigh tat-tessuti bħall-fwied u l-kilwa, il-brix tal-uċuħ mukożali fil-każ tal-apparat gastrointestinali, l-omoġenizzazzjoni u d-diġestjoni enzimika. Il-prova tal-validazzjoni tal-JaCVAM studjat biss ċelloli iżolati, u għalhekk f'termini ta' stabbiliment tal-metodu u sabiex ikun jista' jsir riferiment għad-dejta tal-prova tal-JaCVAM għall-wiri tal-profiċjenza, aħjar jintużaw ċelloli iżolati. Madankollu, intwera li essenzjalment ma hemm ebda differenza essenzjali fir-riżultat tal-assaġġ bejn meta jintużaw ċelloli iżolati u meta jintużaw nuklei iżolati (8). Anki metodi differenti sabiex jiġu iżolati ċ-ċelloli/in-nukleji (eż. omoġenizzazzjoni, tqattigh, diġestjoni enzimatika u filtrazzjoni bix-xibka) taw riżultati komparabbli (55). Konsegwentement, jistgħu jintużaw ċelloli iżolati jew nukleji iżolati. Laboratorju għandu jevalwa bir-regqa u jivvalida l-metodi speċifiċi għat-tessut ta' iżolament ta' ċelloli/nukleji individwali. Kif diskuss fil-paragrafu 40, il-persistenza ta' whud mil-leżjonijiet li jwasslu għall-ħsarat fil-ħjut tad-DNA identifikati mill-assaġġ kometa tista' tkun qasira hafna (52) (53). Għaldaqstant, ikun xi jkun il-metodu użat sabiex jithejjew is-sospensjonijiet taċ-ċelloli/nukleji individwali, importanti li t-tessuti jiġu pproċessati mill-iktar fis possibbli wara li l-annimali jkunu ġew ewtanazzati u jitqiegħdu f'kundizzjonijiet li jnaqqsu t-tneħħija tal-leżjonijiet (eż. billi t-tessut jinżamm f'temperatura baxxa). Is-sospensjonijiet taċ-ċelloli għandhom jinżammu kishin silġ sakemm ikunu lesti sabiex jintużaw, sabiex ikun jista' jintwera li hemm varjazzjoni minima bejn il-kampjuni u risponsi tal-kontroll pożittiv u negattiv xierqa.

▼ **M7****PREPARAZZJONI TAL-LAMETTI**

Il-preparazzjoni tal-lametti għandha ssir mill-iktar fis possibbli (idealment f'temp ta' siegħa) wara l-preparazzjoni taċ-ċelloli/nukleji individwali, iżda t-temperatura u l-hin bejn il-mewt tal-annimal u l-preparazzjoni tal-lametta għandhom ikunu kkontrollati bir-reqqa u vvalidati fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju. Il-volum tas-sospensjoni taċ-ċelloli miżjuda mal-agarozju b'punt tat-tidwib baxx (normalment 0.5-1.0 %) sabiex isiru l-lametti ma għandux inaqas il-perċentwal tal-agarozju b'punt tat-tidwib baxx għal inqas minn 0.45 %. Id-densità ottimali taċ-ċelloli sejra tiġi stabbilita bis-sistema ta' analiżi tal-immāgnijiet użata għall-ghadd tal-kometi.

Il-lizi

Il-kundizzjonijiet tal-lizi huma varjabbli b'mod kritiku wkoll u jistgħu jxekklu fil-hsarat fil-hjut li jirriżultaw minn tipi speċifiċi ta' modifiki tad-DNA (ċerti alkilazzjonijiet tad-DNA u addotti bażi). Għaldaqstant huwa rakkomandat li l-kundizzjonijiet tal-lizi jinżammu l-iktar kostanti possibbli għal-lametti kollha fi hdan esperiment. Ladarba jithejjew, il-lametti għandhom jitghaddsu f'soluzzjoni tal-lizi mkessha għal tal-inqas siegħa (jew tul il-lejl) f'madwar 2-8 °C f'kundizzjonijiet ta' dawl bati eż. dawl isfar (jew fid-dlam) li jevitaw esponiment għal dawl abjad li jista' jkun fih komponenti tal-UV. Wara dan il-perjodu ta' inkubazzjoni, il-lametti għandhom jitlahalhu sabiex jitneħħa d-deterġent u l-imluħ residwi qabel l-istadju ta' tahlil tal-alkali. Dan jista' jsir bl-użu ta' ilma purifikat, bafer ta' newtralizzazzjoni jew bafer tal-fosfat. Jista' jintuża wkoll bafer tal-elettroforezi. Dan iżomm il-kundizzjonijiet alkalini fil-kompartiment tal-elettroforezi.

Tahlil u elettroforezi

Il-lametti għandhom jitqiegħdu b'mod aleatorju fuq il-pjattaforma ta' unità tal-elettroforezi tat-tip sottomarin li jkun fiha biżżejjed soluzzjoni tal-elettroforezi b'tali mod li l-uċuħ tal-lametti jkun mghottijin għalkollox (il-fond li fih huma mghottijin għalkollox għandu jkun konsistenti bejn sessjoni u ohra wkoll). F'tip iehor ta' unitajiet tal-elettroforezi tal-assaġġ kometa, jiġifieri bi tkessih attiv, ċirkulazzjoni u provvista tal-enerġija b'kapaċità għolja, soluzzjoni li tghatti iktar fonda tirriżulta f'kurrent elettriku ikbar filwaqt li l-vultaġġ jibqa' kostanti. Għandu jintuża disinn ibbilanċjat sabiex il-lametti jitqiegħdu fit-tank tal-elettroforezi sabiex jiġu mitigati l-effetti ta' kwalunkwe xejra jew effett fit-tarf ġewwa t-tank u sabiex titnaqqas kemm jista' jkun il-varjabbiltà bejn lott u iehor, jiġifieri f'kull sessjoni tal-elettroforezi, għandu jkun hemm għandu jkun inkluz l-istess numru ta' lametti minn kull annimal fl-istudju u kampjuni mill-gruppi tad-dozaġġ differenti, il-kontrolli negattivi u pożittivi. Il-lametti għandhom jithallew għal tal-inqas 20 minuta sabiex id-DNA jinhall mill-koljatura, u mbagħad jiġu soġġetti għal elettroforezi f'kundizzjonijiet ikkontrollati li sejin jimmassimizzaw is-sensittività u l-medda dinamika tal-assaġġ (jiġifieri f'livelli aċċettabbli ta' % tad-DNA tad-dnieb għal kontrolli negattivi u pożittivi li jimmassimizzaw is-sensittività). Il-livell tal-migrazzjoni tad-DNA huwa assoċjat b'mod lineari mad-durata tal-elettroforezi, u anki mal-potenzjal (V/cm). Fuq il-bażi tal-prova tal-JaCVAM, dan jista' jkun 0.7 V/cm għal tal-inqas 20 minuta. Id-durata tal-elettroforezi titqies li hija varjabbli kritiku u l-hin tal-elettroforezi għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi ottimizata l-medda dinamika. Hinijiet itwal tal-elettroforezi (eż. 30 jew 40

▼ M7

minuta sabiex tiġi massimizzata s-sensittività) normalment iwasslu għal risponsi pożittivi iktar b'saħħithom b'mutaġeni magħrufin. Madankollu, hinijiet itwal tal-elettroforezi jistgħu jwasslu wkoll għal migrazzjoni eċċessiva fil-kampjuni tal-kontroll. F'kull esperiment, il-vultaġġ għandu jinżamm kostanti, u l-varjabbiltà fil-parametri l-oħrajn għanda tkun fi hdan medda ristretta u speċifikata, pereżempju fil-prova tal-JaCVAM 0.7 V/cm fornew kurrent tal-bidu ta' 300 mA. Il-fond tal-bafer għandu jiġi aġġustat sabiex jinkisbu l-kundizzjonijiet meħtieġa u għandu jinżamm matul l-esperiment kollu. Il-kurrent fil-bidu u fi tmiem il-perjodu tal-elettroforezi għandu jiġi rreġistrat. Għaldaqstant, il-kundizzjonijiet ottimali għandhom jiġu stabbiliti matul il-wiri inizjali tal-profiċjenza fil-laboratorju kkonċernat b'kull tessut studjat. It-temperatura tas-soluzzjoni tal-elettroforezi permezz tat-tahlil u l-elettroforezi għandha tinżamm baxxa, normalment 2-10 °C (10). It-temperatura tas-soluzzjoni tal-elettroforezi fil-bidu tat-tahlil, il-bidu tal-elettroforezi, u tmiem l-elettroforezi għandha tiġi rreġistrata.

Wara li tlestia l-elettroforezi, il-lametti għandhom jitgħaddsu/jitlaħalhu fil-bafer ta' newtralizzazzjoni għal tal-inqas 5 minuti. Il-ġellijiet jistgħu jitlewnu u jingħataw punteġġ "friski" (eż. fi żmien jum jew jumejn) jew jistgħu jiġu deidratati sabiex jingħataw punteġġ iktar tard (eż. fi żmien ġimgħa jew ġimgħtejn wara t-tilwin) (56). Madankollu, il-kundizzjonijiet għandhom jiġu vvalidati matul il-wiri tal-profiċjenza u d-dejta storika għandha tinkiseb u tinżamm b'mod separat għal kull waħda minn dawn il-kundizzjonijiet. Fl-aħħar każ, il-lametti għandhom jiġu deidratati b'immersjoni fl-etanol assolut għal tal-inqas 5 minuti, jithallew jinxfu bl-arja, u mbagħad jinħażnu, jew f'temperatura ambjentali jew inkella f'kontenitur fi friġġ sakemm jingħataw punteġġ.

Metodi tal-Kejl

Il-kometi għandhom jingħataw punteġġ b'mod kwantitattiv bl-użu ta' sistema awtomatizzata jew semiautomatizzata ta' analiżi tal-immagħnijiet. Il-lametti sejrini jitlewnu b'tilwin fluworexxenti xieraq, eż. SYBR Gold, Green I, jodur tal-propidju jew bromur tal-etidju u jitkejlu b'lenti ffokata kif xieraq (eż. 200x) taħt mikroskopju mgħammar b'epifluworexxenza u detetturi xierqa jew kamera diġitali (eż. CCD).

Iċ-ċelloli jistgħu jiġu kklassifikati fi tliet kategoriji kif deskritti fl-atlas tal-immagħnijiet tal-kometa (57), jiġifieri jistgħu jingħaddu, ma jistgħux jingħaddu u "qanfud" (ara l-paragrafu 56 għal diskussjoni iktar dettaljata). Ċelloli li jistgħu jingħaddu biss (ras u denb defiiti ċari bla ebda interferenza ma' ċelloli biswit) għandhom jingħaddu għall- % tad-DNA tad-dnieb sabiex jiġu evitati artefatti. Ma hemmx bżonn li tiġi rrapportata l-frekwenza taċ-ċelloli li ma jistgħux jingħaddu. Il-frekwenza tal-qniefed għandha tiġi stabbilita fuq il-bażi tal-punteġġ viżwali (peress li n-nuqqas ta' ras definita ċara sejjer ifisser li ma jistgħux jiġu identifikati minnufih bl-analiżi tal-immagħnijiet) ta' tal-inqas 150 ċellola għal kull kampjun (ara l-paragrafu 56 għal diskussjoni iktar dettaljata) u dokumentata għaliha.

Il-lametti kollha għall-analiżi, inkluzi dawk tal-kontrolli pożittivi u negattivi, għandhom jiġu kodifikati b'mod indipendenti u jingħaddu "mgħammdin" sabiex min jaqrahom ma jkunx jaf x'inhi l-kundizzjoni tat-trattament. Għal kull kampjun (għal kull tessut għal kull animal), għandhom jiġu analizzati tal-inqas 150 ċellola (eskluzi qniefed — ara l-paragrafu 56). L-ghadd ta' 150 ċellola għal kull animal f'tal-inqas 5 animali għal kull doza (inqas fil-kontrolli pożittivi parallel — ara l-paragrafu 29) jipprovdi saħħa statistika adegwata skont l-analiżi ta' Smith *et al.*, 2008 (5). Jekk jintużaw il-lametti, dan jista' jkun minn 2 jew 3 lametti magħdudin għal kull kampjun meta jintużaw hames animali għal kull grupp. Għandhom jiġu osservati bosta partijiet tal-lametta f'densità li tiżgura li ma jkun hemm ebda trikkib tad-dnieb. Għandu jiġi evitat l-ghadd fit-truf tal-lametti.

Il-hsarat fil-hjut tad-DNA fl-assaġġ kometa jistgħu jitkejlu b'punti ta' tmiem indipendenti bħall- % tad-DNA tad-dnieb, it-tul tad-denb u l-mument tad-denb. It-tliet kejljet kollha kemm huma jistgħu jsiru jekk tintuża s-sistema xierqa ta' softwer ta' analiżi tal-immagħnijiet. Madankollu, il- % tad-DNA tad-dnieb (magħruf ukoll bħala l- % tal-intensità tad-dnieb) huwa rakkomandat għall-evalwazzjoni u l-interpretazzjoni tar-riżultati (12) (40) (41) (42), u huwa stabbilit bl-intensità tal-frammenti tad-DNA fid-denb espressa bħala perċentwal tal-intensità totali taċ-ċellola (13).

▼ M7

Hsara fit-tessut u ċitotossicità

Sejbiet pozittivi fl-assaġġ kometa jaf ma jkunux dovuti biss għall-ġenotossicità, it-tossicità tat-tessut fil-mira tista' tirrizulta wkoll f'żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA (12) (41). Għall-kuntrarju, ċitotossicità baxxa jew moderata spiss tidher b'ġenotossini magħrufin (12), xi haġa li turi li mhuwiex possibbli li ssir distinzjoni bejn migrazzjoni tad-DNA indotta mill-ġenotossicità u dik indotta miċ-ċitotossicità fl-assaġġ kometa wahdu. Madankollu, meta jiġu osservati żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA, huwa rakkomandat li ssir eżaminazzjoni ta' indikatur wiehed jew iktar taċ-ċitotossicità peress li din tista' tghin fl-interpretazzjoni tas-sejbiet. Żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA fil-preżenza ta' evidenza ċara ta' ċitotossicità għandhom jiġu interpretati bil-galbu.

Gew proposti hafna kejljet taċ-ċitotossicità u, minn dawn, il-bidliet istopatoloġiċi jitqiesu li huma kejl rilevanti tat-tossicità tat-tessut. Osservazzjonijiet bħal infjammazzjoni, infiltrazzjoni taċ-ċelloli, bidliet apoptotiċi jew nekrotiċi ġew assoċjati ma' żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA, madankollu, kif muri mill-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (12), ma hemm ebda lista definittiva ta' bidliet istopatoloġiċi li dejjem ikunu assoċjati ma' migrazzjoni ikbar tad-DNA għad-dispożizzjoni. Anki bidliet fil-kejljet tal-kimika klinika (eż. AST, ALT) jistgħu jipprovdu informazzjoni siewja fuq il-hsarat fit-tessut u jistgħu jiġu kkunsidrati wkoll indikaturi addizzjonali bħal attivazzjoni tal-kaspażi, tilwin TUNEL, tilwin tal-Annessin V, eċċ. Madankollu, fitt li xejn hemm dejta ppubblikata fejn dawn tal-ahħar intużaw għal studji *in vivo* u whud jaf ikunu inqas affidabbli minn oħrajn.

Qniefed (jew shabiet, ċelloli fatati) huma ċelloli li jesibixxu immaġni mikroskoppika li tikkonsisti f'ras żgħira jew inezistenti, u dnieb diffużi twal u jitqiesu li huma ċelloli li garrbu hsara kbira, għad li l-etjoloġija tal-qniefed mhijiex ċerta (ara l-Appendiċi 3). Minhabba d-dehra tagħhom, il-kejljet tal- % tad-DNA tad-dnieb bl-analizi tal-immaġnijiet ma jitsgħux jingraw u, għalhekk, il-qniefed għandhom jiġu evalwati b'mod separat. Għandha tittiehed nota u tiġi rrapportata l-okkorrenza tal-qniefed u kwalunkwe zieda rilevanti li hija ssuspettata li hija dovuta għas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi investigata u interpretata bil-galbu. L-għarfien tal-modalità ta' azzjoni potenzjali tas-sustanzi kimiċi tat-test jista' jghin fit-tali kunsiderazzjonijiet.

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

L-annimal huwa l-unità sperimentali u, għalhekk, kemm id-dejta dwar l-annimali individwali kif ukoll ir-riżultati miġburin fil-qosor għandhom jiġu pprezentati f'forma ta' tabelli. Minhabba l-għamla ġerarkika tad-dejta, huwa rakkomandat li jiġi stabbilit il- % medju tad-DNA tad-dnieb għal kull lametta u li jiġi kkalkolat il-medju tal-valuri medjani għal kull annimal (12). Imbagħad tiġi stabbilita l-medja tal-medji tal-annimal individwali sabiex tingħata medja tal-grupp. Dawn il-valuri kollha għandhom ikunu inkluzi fir-rapport. Jistgħu jintużaw approċċi alternattivi (ara l-paragrafu 53) jekk ikunu xjentifikament u statistikament iġġustifikati. L-analizi statistika tista' ssir bl-użu ta' firxa ta' approċċi (58) (59) (60) (61). Meta jintgħażlu l-metodi statistiċi li sejr in jintużaw, il-htieġa ta' trasformazzjoni (eż. log jew gherq kwadrat) tad-dejta u/jew zieda ta' numru żgħir (eż. 0.001) għall-valuri kollha (anki mhux zero) sabiex jiġu mitigati l-effetti tal-valuri taċ-ċelloli zero, għandhom jiġu kkunsidrati kif diskuss fir-referenzi msemmijin hawn fuq. Fl-Appendiċi 2 jingħataw id-dettalji tal-analizi tal-interazzjonijiet bejn it-trattament u s-sess meta jintużaw iż-żewġ sessi, u l-analizi sussegwenti tad-dejta meta jinstabu differenzi jew ma tinstab ebda differenza. Għandha tiġi rrapportata dejta dwar it-tossicità u s-sinjali kliniċi wkoll.

Kriterji ta' Aċċettabilità

L-aċċettazzjoni ta' test hija bbażata fuq il-kriterji li ġejjin:

- a. Il-kontroll negattiv parallel jitqies aċċettabbli għaž-zieda fid-database storika tal-kontroll negattiv tal-laboratorju kif deskritt fil-paragrafu 16.

▼ **M7**

- b. Il-kontrolli negattivi paralleli (ara l-paragrafu 29) għandhom jinduċu risponsi li huma kompatibbli ma' daww iġġenerati fid-database storika tal-kontrolli pożittivi u jipproduċu żieda statistikament sinifikanti meta mqabblin mal-kontrolli negattivi paralleli.
- c. Ġew analizzati numri adegwati ta' ċelloli u konċentrazzjonijiet (paragrafi 52 u 36-38).
- d. Il-kriterji għall-għażla tal-ogħla doża huma konsistenti ma' daww deskritti fil-paragrafu 36.

Evalwazzjoni u Interpretazzjoni tar-Riżultati

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija pożittiva biċ-ċar jekk:

- a. tal-inqas waħda mid-dożi tat-test turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontrolli negattivi paralleli,
- b. iż-żieda hija marbuta mad-doża meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- c. kwalunkwe wiehed mir-riżultati jaqa' barra mid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontrolli negattivi għal speċijiet, veikolu, rotta u tessuti partikolari u numru ta' amministrazzjonijiet.

Meta jiġu ssodisfati dawn il-kriterji kollha, is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata kapaċi tinduċi ħsara fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti studjati f'din is-sistema tat-test. Jekk huwa ssodisfat kriterju wiehed jew tnejn minn dawn il-kriterji, ara l-paragrafu 62.

Diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettabilità kollha, sustanza kimika tat-test titqies li hija negattiva biċ-ċar jekk:

- a. l-ebda waħda mill-konċentrazzjonijiet tat-test ma turi żieda statistikament sinifikanti meta mqabbla mal-kontrolli negattivi paralleli,
- b. ma hemm l-ebda żieda marbuta mal-konċentrazzjoni meta tiġi evalwata b'test xieraq tat-tendenzi,
- c. ir-riżultati kollha jaqgħu fid-distribuzzjoni tad-dejta storika tal-kontrolli negattivi għal speċijiet, veikolu, rotta u tessuti partikolari u numru ta' amministrazzjonijiet.
- d. tkun ingħatat l-evidenza diretta jew indiretta li ssostni l-esponiment ta', jew it-tossiċità għat-tessut(i) fil-mira.

Is-sustanza kimika tat-test imbagħad tiġi kkunsidrata li mhijiex kapaċi tinduċi ħsara fil-ħjut tad-DNA fit-tessuti studjati f'din is-sistema tat-test.

Ma hemm l-ebda hteġa għall-verifika ta' rispons pożittiv jew negattiv ċar.

F'każ li r-rispons la jkun negattiv ċar u lanqas pożittiv ċar (jiġifieri mhumix issodisfati l-kriterji kollha elenkati fil-paragrafi 59 jew 60) u sabiex tghin fl-istabbiliment tar-rilevanza bijoloġika ta' riżultat, id-dejta għandha tiġi evalwata b'għudizzju esperti u/jew b'investigazzjonijiet ulterjuri mwettqin, jekk ikunu għus-tifikati xjentifikament. L-għadd ta' ċelloli addizzjonali (fejn xieraq) jew it-tweqqi ta' esperiment ripetut possibbilment bl-użu ta' kundizzjonijiet ottimizzati tal-esperiment (eż. spazjar tad-dożi, rotot oħrajn tal-amministrazzjoni, hinijiet tal-kamp-junar oħrajn jew tessuti oħrajn) jista' jkun siewi.

F'każijiet rari, anki wara investigazzjonijiet ulterjuri, is-sett ta' dejta sejjer jipprekludi milli tinhareġ konkluzjoni ta' riżultati pożittivi jew negattivi u, għalhekk, sejjer jiġi konkluz bħala ekwivoku.

▼ **M7**

Sabiex tiġi vvalutata r-rilevanza bijoloġika ta' riżultat pozittiv jew ekwivoku, hemm bżonn ta' informazzjoni dwar iċ-ċitotossicità fit-tessut fil-mira (ara l-paragrafi 54-55). Meta sejbiet pozittivi jew ekwivoċi jiġu osservati biss fil-preżenza ta' evidenza ċara ta' ċitotossicità, l-istudju jiġi konkluż bħala ekwivoku għall-ġenotossicità sakemm ma jkunx hemm biżżejjed informazzjoni li ssostni konklużjoni definittiva. Fil-każijiet ta' eżitu tal-istudju negattiv fejn ikun hemm sinjali ta' tossicità fid-dożijiet kollha ttestjati, jista' jkun xieraq li jsir studju ulterjuri b'dożi mhux tossiċi.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test:

- is-sors, in-numru tal-lott jekk disponibbli;
- l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, id-data limitu għall-użu jew id-data għall-analiżi mill-ġdid, jekk magħrufa.

Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubilità fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.

Sustanzi multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

- ikkaratterizzati safejn possibbli mill-identità kimika (ara iktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Solvent/veikolu:

- il-ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu;
- is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/veikolu, jekk magħrufin;
- il-preparazzjoni tal-formulazzjonijiet tad-doża;
- id-determinazzjonijiet analitiċi dwar il-formulazzjonijiet (eż., l-istabilità, l-omoġenità, il-koncentrazzjonijiet nominali).

L-annimali tat-test:

- l-ispeċi/ir-razza użata u ġustifikazzjonijiet xjentifiċi u etiċi għall-għażla;
- l-għadd, l-età u s-sess tal-annimali;
- is-sors, il-kundizzjonijiet tal-abitazzjoni, id-dieta, l-arrikkiment, eċċ.;
- il-piż individwali tal-annimali fil-bidu u fi tmiem it-test, inklużi l-medda tal-piż tal-ġisem, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp.

Kundizzjonijiet tat-test:

- dejta tal-kontroll pozittiv u negattiv (veikolu/solvent);

▼ **M7**

- riżultati mill-istudju għat-tiftix tal-medda (jekk sar);
- ir-raġuni għall-ghażla tal-livell tad-doża;
- dettalji dwar il-preparazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- dettalji dwar l-ghoti tas-sustanza kimika tat-test;
- ir-raġuni għar-rotta tal-amministrazzjoni;
- is-sit tal-injezzjoni (għal studji taht il-gilda jew ġol-vina);
- metodi għall-preparazzjoni tal-kampjun, fejn disponibbli, analizzjiet istopatoloġiċi, speċjalment għal sustanza kimika li tagħti rispons pożittiv tal-kometa;
- ir-raġuni għall-ghażla tat-tessut;
- il-metodi għall-verifika li s-sustanza kimika tat-test lahqet it-tessut fil-mira, jew iċ-ċirkolazzjoni ġenerali, jekk jinkisbu riżultati negattivi;
- id-doża propja (mg/kg piż tal-ġisem/jum) ikkalkolata mill-koncentrazzjoni (ppm) u l-konsum tas-sustanza kimika tat-test fid-dieta/ilma tax-xorb, jekk applikabbli;
- dettalji dwar il-kwalità tad-dieta u tal-ilma;
- deskrizzjoni dettaljata tal-iskedi tat-trattament u tal-kampjunar u ġustifikazzjonijiet għall-ghażliet (eż. dejta tossikokinetika, fejn disponibbli);
- il-metodu ta' taffija mill-uġigh, l-analgeżija;
- il-metodu tal-ewtanazja;
- il-proċeduri għall-izolament u l-preservazzjoni tat-tessuti;
- il-metodi għall-preparazzjoni tas-sospensjoni taċ-ċellola/nukleu individwali;
- is-sors u n-numru tal-lott tar-reagenti kollha (fejn possibbli);
- il-metodi għall-evalwazzjoni taċ-ċitotossicità;
- il-kundizzjonijiet tal-elettroforezi;
- it-tekniki tat-tilwin użati; u
- il-metodi għall-ghadd u l-kejl tal-kometa.

Ir-riżultati:

- L-osservazzjonijiet kliniċi ġenerali, jekk jeżistu, qabel u matul il-perjodu ta' ttestjar għal kull animal;
- evidenza taċ-ċitotossicità jekk issir;

▼ **M7**

- għal studji itwal minn ġimgħa: Il-piżijiet tal-ġisem individwali matul l-istudju, inklużi l-medda tal-piż individwali, id-devjazzjoni medja u standard għal kull grupp; il-konsum tal-ikel;
- ir-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons, fejn tkun evidenti;
- għal kull tessut/animal, il- % tad-DNA tad-dnieb (jew kejliet oħrajn, jekk jintgħażlu) u l-valuri medjani għal kull lametta, il-valuri medji għal kull animal u l-valuri medji għal kull grupp;
- dejta ta' kontroll negattiv konkurrenti u storiku b'meded, medji/medjani u devjazzjonijiet standard għal kull tessut evalwat;
- dejta storika tal-kontroll pożittiv u parallel;
- għal tessuti li mhumiex il-fwied, kurva ta' doża — rispons bl-użu tal-kontroll pożittiv. Din tista' tkun minn dejta migbura matul il-wiri tal-profiċjenza (ara l-paragrafi 16-17) u għandha tkun akkumpanjata minn ġustifikazzjoni, b'referenzi mit-tagħrif attwali, għax-xerqien tal-kobor u t-tifrix tar-risponsi għall-kontrolli f'dak it-tessut;
- l-analizzijiet statistiċi u l-metodi applikati; u l-kriterji sabiex rispons jitqies pożittiv, negattiv jew ekwivoku;
- il-frekwenza ta' qniefed f'kull grupp u għal kull animal.

*Diskussjoni tar-riżultati**Konklużjoni**Referenzi***TAGHRIF**

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. *et al.* (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- (3) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- (5) Smith, C.C. *et al.* (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- (6) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. *et al.* (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- (8) Tice, R.R. *et al.* (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼ **M7**

- (9) Singh, N.P. *et al.* (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. *et al.* (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- (11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.
- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- (16) Rothfuss, A. *et al.* (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. *et al.* (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.
- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- (20) Recio, L. *et al.* (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- (23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼ **M7**

- (25) Toyozumi, T. *et al.* (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- (26) Struwe, M. *et al.* (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- (27) Wada, K. *et al.* (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- (28) (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.
- (29) Burlinson, B. *et al.* (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (30) Jackson, P. *et al.* (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. *et al.* (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. *et al.* (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity**, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.
- (35) Cordelli, E. *et al.* (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- (37) Pfuhrer, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay**, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.
- (41) Burlinson, B. *et al.* (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. *et al.* (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- (44) Möller, P. *et al.* (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. *et al.* (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- (46) Azqueta, A. *et al.* (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.
- (47) Hayashi, M. *et al.* (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)
- (50) Il-Kapitolu B.8 ta' dan l-Anness: *Tossicità ta' Inalazzjoni Subakuta: Studju ta' 28 Jum.*
- (51) Il-Kapitolu B.29 ta' dan l-Anness: *Tossicità ta' Inalazzjoni Subkronika: Studju ta' 90 Jum.*
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.
- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.
- (54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
- (56) Hartmann, A. *et al.* (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼ M7

- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
- (60) Bright, J. *et al.* (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼ **M7***Appendiċi 1*

DEFINIZZJONIJIET

Elettroforezi alkalina b'ġell ta' ċellola waħda: Teknika sensittiva għall-identifikazzjoni ta' hsara primarja fid-DNA fil-livell ta' ċelloli/nukleu individwali.

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita

Kometa: Il-forma li jadottaw in-nukleojdi wara li jiġu sottomessi għal kamp elettroforetiku wiehed, minhabba s-similarità tiegħu għall-kometi: ir-ras hija n-nukleu u d-denb huwa kostitwit mid-DNA li jimxi 'l barra min-nukleu fil-kamp elettriku.

Varjabbli/parametru kritiku: Dan huwa varjabbli tal-protokoll li għalih bidla żgħira jista' jkollha impatt kbir fuq il-konkluzjoni tal-assaġġ. Varjabbli kritiċi jistgħu jkunu speċifiċi għat-tessut. Varjabbli kritiċi ma għandhomx ikunu mibdulini, speċjalment t-test, minghajr ma jiġi kkunsidrat kif l-alterazzjoni se jrid tibdel rispons tal-assaġġ, pereżempju kif indikat mill-kobor u l-varjabilità fil-kontrolli pożittivi u negattivi. Ir-rapport tat-test għandu jelenka l-alterazzjonijiet tal-varjabbli kritiċi li saru matul it-test jew imqabblin mal-protokoll standard għal-laboratorju u jipprovdi ġustifikazzjoni għal kull alterazzjoni.

L-intensità tad-dnieb jew il- % tad-DNA tad-dnieb: Dan jikkorrisponi għall-intensità tad-denb tal-kometa fir-rigward tal-intensità totali (ras u denb). Dan jirrifletti l-ammont ta' hsara fid-DNA, espressa bħala perċentwal.

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

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

▼ **M7***Appendiċi 2***ID-DISINN FATTORJALI GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TAD-DIFFERENZI BEJN IS-SESSI FL-ASSAĠĠ KOMETA *IN VIVO*****Id-disinn fattorjali u l-analiżi tiegħu**

F'dan id-disinn, jiġu ttestjati tal-inqas 5 irġiel u 5 nisa f'kull livell tal-konċentrazzjoni li jirriżultaw f'disinn li juża tal-inqas 40 animal (20 raġel u 20 mara, flimkien ma' kontrolli pozittivi rilevanti).

Id-disinn, li huwa wiehed mill-iktar disinni fattorjali sempliċi, huwa ekwivalenti għal analiżi bidirezzjonali tal-varjanza bis-sess u l-livell ta' konċentrazzjoni li huma l-effetti ewlenin. Id-dejta tista' tiġi analizzata billi jintużaw pakketti ta' softwer statistiku standard bħal SPSS, SAS, STATA, Genstat kif ukoll bl-użu ta' R.

L-analiżi tagħmel partizzjoni tal-varjabbiltà fis-sett ta' dejta bejn is-sessi, bejn il-konċentrazzjonijiet u b'raba mal-interazzjoni bejn is-sessi u l-konċentrazzjonijiet. Kull wiehed mit-termini jiġi ttestjat kontra stima tal-varjabbiltà bejn l-annimali rreplikati fi hdan il-gruppi ta' annimali tal-istess sess bl-istess konċentrazzjoni. Id-dettalji shah dwar il-metodoloġija sottostanti huma disponibbli f'hafna kotba standard dwar l-istatistika (ara r-referenzi) u fil-faċilitajiet tal-ghajjnuna pprovduti mal-pakketti statistiċi.

L-analiżi tkompli billi ssir spezzjoni tat-terminu ta' interazzjoni sess x konċentrazzjoni fit-tabella ANOVA ⁽¹⁾. Fin-nuqqas ta' terminu ta' interazzjoni sinifikanti, il-valuri kombinati bejn is-sessi jew fost il-livelli ta' konċentrazzjoni jipprovdu testijiet statistiċi validi bejn il-livelli bbażati fuq it-terminu tal-varjabbiltà tar-raggruppati fi hdan il-grupp tal-ANOVA.

L-analiżi tkompli billi tagħmel partizzjoni bejn l-istima tal-varjabbiltà bejn il-konċentrazzjonijiet f'kuntrasti li jipprovdu għal test għal kuntrasti lineari u kwadratiċi tar-risponsi bejn il-livelli tal-konċentrazzjonijiet. Meta jkun hemm interazzjoni sinifikanti sess x konċentrazzjoni, tista' ssir partizzjoni ta' dan it-terminu f'kuntrasti ta' interazzjoni lineari x sess u kwadradiku x sess ukoll. Dawn it-termini jipprovdu testijiet ta' jekk ir-risponsi għall-konċentrazzjoni humiex paralleli għaż-żewġ sessi jew jekk hemmx rispons differenzjali bejn iż-żewġ sessi.

L-istima tal-varjabbiltà tal-miġburin fi hdan il-grupp tista' tintuża sabiex tipprovdi testijiet bejn il-pari tad-differenza bejn il-medji. Dawn il-paraguni jistgħu jsiru bejn il-medji għaż-żewġ sessi u bejn il-medji għal-livell ta' konċentrazzjoni differenti bħal fil-każ tal-paraguni mal-livelli tal-kontroll negattiv. F'dawk il-każijiet li fihom ikun hemm interazzjoni sinifikanti, jistgħu jsiru paraguni bejn il-medji ta' konċentrazzjonijiet differenti fi hdan sess jew bejn il-medji tas-sessi fl-istess konċentrazzjoni.

Referenzi

Hemm hafna kotba dwar l-istatistika li jiddiskutu t-teorija, id-disinn, il-metodoloġija, l-analiżi u l-interpretazzjoni tad-disinni fattorjali li jvarjaw mill-iktar analiżijiet b'żewġ fatturi sempliċi sal-iktar forum kumplessi użati fil-metodoloġija dwar id-Disinn tal-Esperiment. Din li ġejja mhijiex lista ezawrjenti. Uħud mill-kotba jipprovdu eżempji maħdumin ta' disinni komparabbli, f'ċerti każijiet b'ko-diċi għat-tweġiq tal-analiżijiet bl-użu ta' diversi pakketti ta' softwer.

⁽¹⁾ L-esperti tal-istatistika li jiehdu approċċ għall-immudellar bħal dak li juża Mudelli Lineari Generali (GLMs) jistgħu jagħmlu l-analiżi b'mod differenti iżda paragunabbli iżda mhux bilfors iħaddmu t-tabella ANOVA tradizzjonali, li tmur lura għal approċċi algoritmici tal-kalkolu tal-istatistika żviluppati qabel il-miġja tal-kompjuters.

▼ M7

- (1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.
- (2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.
- (3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.
- (4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.
- (5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.
- (6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.
- (7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼ M7

Appendiċi 3

LIMITAZZJONIJIET ATTWALI TAL-ASSAĠĠ

Minhabba l-istat attwali tal-ġharfien, bosta limitazzjonijiet huma assoċjati mal-assaġġ kometa *in vivo*. Huwa mistenni li dawn il-limitazzjonijiet se jrin jonqsu jew jiġu definiti b'mod iktar speċifiku peress li hemm iktar esperjenza bl-applikazzjoni tal-assaġġ sabiex iwieġeb għal kwistjonijiet marbutin mas-sikurezza f'kuntest regolatorju.

1. Ċerti tipi ta' hsara fid-DNA jistgħu jkunu qosra, jiġifieri jistgħu jissewew malajr wisq sabiex jilhq jigu osservati 24 siegħa jew iktar wara l-aħħar doża. Ma hemm ebda lista identifikabbli tat-tipi ta' hsarat qosra, u lanqas tas-sustanzi kimiċi li aktarx li jikkaġunaw dan it-tip ta' hsara, u lanqas ma huwa magħruf kemm irid jgħaddi hin sabiex ikun jista' jiġi individwat dan it-tip ta' hsara. Il-hin(ijiet) tal-kampjunar ottimali jista' jkun speċifiku għas-sustanza kimika jew għar-rotta u l-hinijiet tal-kampjunar għadhom jigu stab-biliti minn dejta kinetika (pereżempju l-hin, T_{max} , li fih tinkiseb il-quċċata tal-plazma jew il-konċentrazzjoni fit-tessut), meta tkun teżisti t-tali dejta. Hafna mill-istudji ta' validazzjoni li jsostnu dan il-metodu ta' ttestjar speċifikaw nekropsija sagħtejn jew tlieta wara l-amministrazzjoni tal-aħħar doża. Hafna mill-istudji fit-tagħrif ippubblikat jiddeskrivu l-amministrazzjoni tal-aħħar doża bejn sagħtejn sa sitt sigħat qabel is-sagrifikar. Għaldaqstant, dawn l-esperjenzi ntużaw bħala l-bażi għar-rakkomandazzjoni fil-metodu ta' ttestjar li, fin-nuqqas ta' dejta li tindika xi haġa ohra, l-aħħar doża għandha tingħata f'punt ta' żmien speċifikat bejn sagħtejn u sitt sigħat wara n-nekropsija.
2. Ma hemm ebda dejta ta' studju identifikabbli li jeżaminaw is-sensittività tat-test għall-identifikazzjoni ta' hsara qasira fid-DNA wara l-ghoti fl-ikel jew l-ilma tax-xorb meta mqabbel mal-ghoti b'gavage. Il-hsara fid-DNA għet individwata wara l-ghoti fl-ghalf u l-ilma tax-xorb, iżda f'it li xejn hemm rapporti bħal dawn meta mqabblin mal-esperjenza ferm ikbar bil-gavage u l-ghoti i.p. B'hekk, is-sensittività tal-assaġġ tista' titnaqqas għal sustanzi kimiċi li jinduċu hsara fil-qosor mogħtijin mal-ikel jew l-ilma tax-xorb.
3. Ma sar ebda studju bejn laboratorji f'tessuti apparti l-fwied u l-istonku, u għalhekk ma għet stabbilita ebda rakkomandazzjoni dwar kif jinkiseb rispons sensitiv u riproduttiv f'tessuti apparti l-fwied, bħal meded tal-kontroll pozittiv u negattiv mistenni. Għall-fwied, lanqas ma seta' jintlaħaq qbil fuq l-issettjar ta' limitu inqas għall-valur tal-kontroll negattiv.
4. Għad li hemm bosta pubblikazzjonijiet li juru l-effett ta' konfużjoni taċ-ċito-tossicità *in vitro*, f'it li xejn għet ippubblikata dejta *in vivo* u għalhekk ma tista' tiġi rakkomandata ebda miżura wahedha taċ-ċitotossicità. Bidliet istopatoloġiċi bħal infjammazzjoni, infiltrazzjoni taċ-ċelloli, bidliet apoptotiċi jew nekrotiċi ġew assoċjati ma' żidiet fil-migrazzjoni tad-DNA, madankollu, kif muri mill-prova ta' validazzjoni tal-JaCVAM (OECD, 2014), dawn il-bidliet mhux dejjem jirriżultaw f'sejbiet tal-kometa pozittivi u, għaldaqstant, ma hemm ebda lista definittiva ta' bidliet istopatoloġiċi li dejjem ikunu assoċjati ma' migrazzjoni ikbar tad-DNA għad-dispożizzjoni. Fl-imghoddi ġie ssuġġerit li qniefed (jew shab, ċelloli fatati) huma indikatur ta' ċitotossicità, madankollu, l-etjoloġija tal-qniefed mhijiex ċerta. Teżisti dejta li tissuġġerixxi li jistgħu jkunu kkaġunati minn ċitotossicità relatata mas-sustanza kimika, hsara mekkani/indotta mill-enzimi mibdija matul it-thejjja tal-kampjun (Guerard *et al.*, 2014) u/jew effett iktar estrem tal-ġenotossicità tas-sustanza kimika tat-test. Dejta ohra donnha turi li huma dovuti għal hsara fid-DNA estensiva, iżda li forsi tista' tisewwa (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼ **M7**

5. It-tessuti jew nukleji taċ-ċelloli ġew iffriżati b'suċċess sabiex jiġu analizzati iktar tard. Normalment dan jirriżulta f'effett li jista' jitkejjel fuq ir-rispons għall-veikolu u l-kontroll pożittiv (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2013). Jekk jużahom, il-laboratorju għandu juri li huwa kompetenti fil-metodoloġiji tal-iffriżar u jikkonferma meded aċċettabbli baxxi tal- % tad-DNA tad-dnieb fit-tessuti fil-mira tal-annimali ttrattati bil-veikolu, u li għadhom jistgħu jiġu individwati risponsi pożittivi. Fit-tagħrif, l-iffriżar tat-tessuti ġie deskritt bl-użu ta' metodi differenti. Madankollu, bħalissa ma hemm ebda qbil fuq kif l-aħjar jiġu ffrizati u jithallew jinhallu t-tessuti, u kif jiġi vvalutat jekk rispons potenzjalment alterat jista' jaffettwa s-sensittività tat-test.
6. Il-hidma riċenti turi li l-lista ta' varjabbli kritika hija mistennija li tkompli tiqsar u li jkomplu jiġu definiti l-parametri għall-varjabbli kritiċi (Guerard *et al.*, 2014).

Referenzi

- (1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.
- (2) Jackson, P. *et al.* (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.
- (3) Lorenzo, Y. *et al.* (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.
- (4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.
- (6) Recio, L. *et al.* (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼B**PARTI Ċ: IL-METODI GHAD-DETERMINAZZJONI TA' L-EKOTOSSICITÀ****WERREJ**

- C.1. TOSSICITÀ AKUTA GHALL HUT
- C.2. IT-TEST TA' L-IMMOBBILIZZAZZJONI AKUTA *DAPHNIA SP.*
- C.3. ALGA TAL-ILMA HELU U ĊJANOBATTERJI, TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR
- C.4. DETERMINAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ LESTA
- PARTI I. KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI
- PARTI II. DOC TEST TAT-TNEHHIJA TAL-KULUR (Metodu C.4-A)
- PARTI III. TEST TA' L-GHAŻLA OECD MODIFIKATA (Metodu °C.4-B)
- PARTI IV. TEST TA' L-EVOLUZZJONI CO₂ (Metodu °C.4-C)
- PARTI V. TEST TAR-RESPIROMETRIJA MANJOMETRIKA (Metodu C.4-D)
- PARTI VI. TEST TAL-FLIXKUN MAGHLUQ (Metodu °C.4-E)
- PARTI VII. TEST M.I.T.I. (Metodu °C.4-F)
- C.5. DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU BIOKEMIKALI
- C.6. DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU KEMIKALI
- C.7. ID-DEGRADAZZJONI – ID-DEGRADAZZJONI ANTIBIOTIKA: L-IDROLISI BHALA FUNZJONI TAL-PH
- C.8. IT-TOSSICITÀ TAL-HNIEX
- C.9. ID-DEGREDAZZJONI BIJOLOĠIKA
- C.10. TRATTAMENT TA' SIMULAZZJONI TESTAEROBIKA TAD-DRANAĠĠ: C.10-A: UNITAJIET TA' HAMA ATTIVAT - C.10-B: BIJORITI
- C.11. HAMA ATTIVATA, TEST TAL-INIBIZZJONI RESPIRATORJA (KARBONJU U OSSIDAZZJONI TAL-AMMONI-JAKA)
- C.12. BIODEGRADAZZJONI
- C.13. BIJOAKKUMULAZZJONI FIL-HUT: ESPONIMENT MILWIEM U DJETETIKU
- Ċ.14. PROVA TA' L-IŻVILUPP FIŻ-ŻGHOŻIJA TAL-HUT
- C.15. PROVA TA' TOSSICITÀ B'TERMINU QASIR FUQ *EMBRIJONI* U STADJI TA' SAC- FRY TAL-HUT
- C.16. NAHAL – PROVA TA' TOSSICITÀ ORALI AKUTA
- C.17. NAHAL – PROVA TA' TOSSICITÀ AKUTA MILL-KUNTATT
- C.18. ADSORBIMENT/DESORBIMENT BL-UŻU TAL-METODU TA' L-EKWILIBRIJU TA' GRUPPI

▼B

- C.19. ESTIMAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENT TA' ADSORPTION (K_{oc}) FUQ IL-HAMRIJA U FUQ HAMA TAD-DRENAĠĠ BL-UŻU TA' KROMATOGRAFIJA TA' LIKWIDU LI JIPPER-FORMA GHOLI (HPLC)
- C.20. TEST TAR-RIPRODUZZJONI DAPHNIA MAGNA
- C.21. MIKROORGANIŻMI TAL-HAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAN- NITROĠENU
- C.22. MIKROORGANIŻMI TAL-HAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAL- KARBONJU
- C.23. TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIL-HAMRIJA
- C.24. TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIS-SEDI-MENT TAS-SISTEMI AKWATIĊI
- C.25. MINERALIZZAZZJONI LI TEHTIEĠ L-OSSIGĠU FL-ILMA TAL-WIĊĊ — TEST TAS-SIMULAZZJONI TAL-BIJODEGRADAZZJONI
- C.26. TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR TAL-ISPEĊI LEMNA
- C.27. TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' SEDIMENT IMHALLAT
- C.28. TEST TAT-TOSSIĊITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA BL-UŻU TA' ILMA FORTIFIKAT
- C.29. BIJODEGRADABBILTÀ FAĊLI - CO₂ F'REĊIPJENTI SSIĠIL-LATI (TEST TA' SPAZJU FUQ)
- C.30. AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' OLIGOCHAETES TERRESTRI
- C.31. TEST TAL-PJANTA TERRESTRI: TFAĊĊJAR TAN-NEBBIET U TEST TAT-TKABBIR TAN-NEBBIET
- C.32. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ENCHYTRAeid
- C.33. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ĦNIEX (*EISENIA FETIDA*/*EISENIA ANDREI*)
- C.34. DETERMINAZZJONI TAL-INIBIZZJONI TAL-ATTIVITÀ TAL-BATTERJI ANAEROBIĊI — TNAQQIS FIL-PRODUZZJONI TAL-GASS MINN HAMA (DRENAĠĠ) B'DIĠESTJONI ANAEROBIKANTI
- C.35. TEST TAT-TOSSIĊITÀ *LUMBRICULUS* TAN-NAQAL/ILMA PERMEZZ TA' NAQAL MIŻJUD
- C.36. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAD-DUD PREDATORJU (*HYPOASPIS* (*GEOLAEAPS*) *ACULEIFER*) FIL-HAMRIJA
- C.37. ASSAĠĠ FUQ 21 JUM TAL-HUT: SKRINJAR FUQ PERJODU QASIR GHAL ATTIVITÀ ESTROĠENIKA U ANDROĠENIKA, U INIBIZZJONI TAL-AROMATAŽI
- C.38. L-ASSAĠĠ TAL-METAMORFOSI TAL-AMFIBJI
- C.39. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-KOLLEMBOLANI FIL-HAMRIJA

▼B

- C.40. TEST TAT-TOSSICITÀ TAČ-ČIKLU TAL-ĦAJJA TAL-KIRONOMIDI F'ILMA TAN-NAQAL BL-UŻU TA' ILMA MIŻJUD JEW NAQAL MIŻJUD
- C.41. TEST TAL-IŻVILUPP SESSWALI TAL-HUT
- C.42. BIJODEGRADABILITÀ FL-ILMA BAĦAR
- C.43. IL-BIJODEGRADABILITÀ ANEJROBIKA TAS-SUSTANZI ORGANIČI FIL-HAMA DIĠESTITA: BIL-KEJL TAL-PRODUZZJONI TAL-GASS
- C.44. LISSIJA F'KOLONNI TAL-HAMRIJA
- C.45. STIMA TAL-EMISSIONIJET MILL-INJAM ITTRATTAT BIL-PRESERVATTIV FL-AMBJENT; IL-METODU TAL-LABORATORJU GHALL-KOMODITAJET TAL-INJAM LI MHUMIEX KOPERTI U LI HUMA F'KUNTATT MA' ILMA HELU JEW ILMA BAĦAR
- C.46. BIJOAKKUMULAZZJONI F'OLIGOČAETI BENTIČI LI JGHIXU FIN-NAQAL
- C.47. TEST TAT-TOSSICITÀ FI STADJU BIKRI TAL-ĦAJJA TAL-HUT
- C.48. ASSAĠĠ TAR-RIPRODUZZJONI TAL-HUT FUQ ŻMIEN QASIR
- C.49. TEST TAT-TOSSICITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAL-HUT (FET)
- C.50. MYRIOPHYLLUM SPICATUM HIELES MIS-SEDIMENT
- C.51. MYRIOPHYLLUM SPICATUM TAS-SEDIMENT TAL-ILMA



C.1. TOSSICITÀ AKUTA GHALL HUT

1. METODU

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop ta' dan it-test huwa sabiex jiddetermina t-tossicità letali akuta ta' sustanza għall-hut fl-ilma helu. Huwa mixtieq li jkun hemm, sa kemm ikun possibbli, informazzjoni dwar is-solubbiltà fl-ilma, il-pressurejoni tal-fwar, l-istabbiltà kimika, ilpkostanti tad-dissoċjazzjoni u tal-biodegrabbiltà tas-sustanza sabiex tghin fil-għażla tal-metodu tat-test l-aktar xieraq (statiku, semi-statiku jew ta' kurrent kontinwu) sabiex ikunu assigurati l-koncentrazzjoninijiet kostanti sodisfaċenti tas-sustanza tat-test matul il-perijodu tat-test.

Informazzjoni addizzjonali (per eżempju l-formula strutturali, il-grad tal-purità, n-natura u l-persentaġġ ta' impuritajiet sinifikanti, l-preżenza u l-ammonti ta' addittivi, u l-koeffiċjent tal-qasma n-oktonal/ilma) għandhom ikunu meqjusa kemm fl-ippjanar tat-test u fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

1.2. DEFINIZZJONIJET U UNITAJET

Tossicità akuta hija l-effett hażin apparenti intiz f'organizmu matul perijodu qasir (jiem) ta' l-espożizzjoni tiegħu għal sustanza. Fit-test preżenti, tossicità akuta hija espressa bħala l-koncentrazzjonini medjana letali (LC_{50}), jiġifieri l-koncentrazzjoni fl-ilma li toqtol 50 % flott ta' prova ta' ġut matul perijodu kontinwu ta' l-espożizzjoni li għandu jkun mistqarr.

Il-koncentrazzjoninijiet kollha tas-sustanza fit-test huma mogħtija bil-piż/volum (milligrammi kull litru). Dawn jistgħu ikunu espressi wkoll bħala piż bil-piż ($mg.kg^{-1}$).

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanza ta' referenza tista tkun ittestjata bħala mezz sabiex turi li l-kondizzjonijiet waqt it-test fil-laboratorju, ir-reazzjoni tal-ispeċi ittestjati ma jkunux inbidlu b'mod sinifikanti.

L-ebda sustanzi ta' referenza ma huma speċifikati f'din il-kitba.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Test limitat jista' jkun imwettaq fi 100 mg kull litru sabiex tkun determinata li il- LC_{50} tkun akbar minn din il-koncentrazzjoni.

Il-hut hu espost għas-sustanza tat-test miżjuda ma' l-ilma fil-medda tal-koncentrazzjonijiet għal perijodu ta' 96 siegħa. Il-mortalitajiet huma irreġistrati fi mill-anqas intervalli ta' 24 siegħa, u l-koncentrazzjoninijiet li joqtlu 50 % tal-hut (LC_{50}) f'kull żmien ta' l-osservazzjoni huma ikkalkolati, meta dan ikun possibbli

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Il-kriterja tal-kwalità għandha tkun applikabbli għal-limitu tat-test kif ukoll għall-metodu tat-test kollu.

Il-mortalità fil-kontrolli m'għandhiex teċċedi 10 % (jew huta wahda jekk anqas minn għaxa jkunu wżati) sat-tmiem tat-test.

Il-koncentrazzjoni ta' l-ossigenu mdewweb għandha tkun ta' aktar minn 60 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja matul iż-żmien kollu.

▼B

Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test għandhom jinżammu sa fil-limitu ta' 80 % tal-konċentrazzjonijiet inizjali matul iż-żmien kollu tat-test.

Għal sustanzi li jdubu faċilment fil-medja tat-test, b'hekk ifornu taħlitiet stabbli, i.e. dawk li ma jkollhomx reazzjoni volatili sinifikanti, jkollhom degradazzjoni, ikunu idrolizzati jew adsorbiti, l-konċentrazzjoni inizjali tista tkun meqjusa bhala ekwivalenti tal-konċentrazzjoni nominali. Evidenza għandha tkun ippreżentata li l-livelli tal-konċentrazzjonijiet ikunu nżammu matul it-test u li l-kriterja tal-kwalità kienet giet milhuqa.

Għal sustanzi li huma:

- (i) f'it li xejn jinhallu fil-medja tat-test, jew
- (ii) kapaċi li jiffurmaw emulsjonijiet jew dispersjonijiet stabbli, inkella
- (iii) ma humiex stabbli f'taħlitiet akweji,

l-konċentrazzjonini inizjali għandha tkun meqjusa bhala l-konċentrazzjoni mkejla fit-taħlita (jew, jekk teknikament dan ma jkunx possibbli, imkejla f'kolonna ta' l-ilma) fil-bidu tat-test. Il-konċentrazzjoni għandha tkun determinata wara perijodu ta' ekwilibriju imma qabel l-introduzzjoni tal-hut tat-test.

Fi kwalunkwe minn dawn il-każi, aktar kejl għandu jsir matul it-test sabiex jikkonferma l-konċentrazzjoni attwali ta' l-espożizzjoni jew li l-kriterja tal-kwalità tkun giet milhuqa.

Il-pH m'għandux ivarja b'aktar minn unità waħda.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Tlett tipi ta' proċedura jistgħu ikunu wżati:

Test statiku:

Test tat-tossiċità li fih l-ebda ċaqlieq ma jsehh tat-taħlita tat-test. (It-taħlitiet jinqgħu minghajr tibdil matul iż-żmien kollu tat-test.)

Test semi-statiku:

Test minghajr ċaqlieq tat-taħlita tat-test, imma bit-tiġdid regolari tal-lottijiet tat-taħlitiet tat-test eara perijodi mtawwla (eż. 24 siegħa).

Test biċ-ċaqlieq kontinwu:

Test tat-tossiċità li fih l-ilma jkun imġedded regolarment fil-kabini tat-test, il-kimika li tkun ittestjata tiġi trasportata ma l-ilma użat għat-tiġdid tal-medja tat-test.

1.6.1. Reaġenti

1.6.1.1. Taħlitiet tas-sustanzi tat-test

Taħlitiet diġa lesti tas-sahha mehtieġa huma preparati bit-tidwib tas-sustanza filma de-jonizzat jew filma skond 1.6.1.2.

Il-konċentrazzjoni tat-test kif magħzula huma ippreparati bit-tidwib tat-taħlita diġa lest. Jekk konċentrazzjonijiet għoljin huma ttestjati, is-sustanza tista' tkun imdewba direttament mat-trattib ta' l-ilma.

▼B

Is-sustanza għandha normalment tkun ittestjata biss sal-limitu tas-solubilità tagħha. Għal uħud mis-sustanzi (eż. sustanzi li jkollhom solubilità baxxa fl-ilma, jew P_{ow9} għoli, jew dawk li jiffurmaw tixriq stabbli pjuttost milli tahlita vera fl-ilma), huwa aċċettabbli li tintuża l-konċentrazzjonini tat-test aktar għolja mil-limitu tal-solubilità tas-sustanza sabiex ikun assigurat li s-solubilità massima/stabilità tal-konċentrazzjoni tkun intlaħqet. Huwa mportanti, b'danakollu, li din il-konċentrazzjoni ma tkunx b'mod iehor thawwad is-sistema tat-test (eż. li jkun hemm rita tas-sustanza fil-wiċċ ta' l-ilma li ma thallix li jsehh l-ossigenazzjoni ta' l-ilma, eċċ.).

Tixrid ultrasoniku, solventi organiċi, emulsifikaturi jew dispersanti jistgħu jintużaw bħala għajjuna għat-thejjja tat-tahlitiet bil-lest ta' sustanzi b'solubilità baxxa fl-ilma jew sabiex jgħinu fit-tixrid ta' dawn is-sustanzi fil-medja tat-test. Meta tali sustanzi awżiljarji huma wżati, il-konċentrazzjoninijiet kollha tat-test għandhom jinkludu l-istess ammont tas-sustanza awżiljarja, u ħut addizzjonali tal-kontroll għandhom ikunu esposti għall-istess konċentrazzjoni tas-sustanza awżiljarja bħal dik użata fis-serje tat-test. Il-konċentrazzjoni ta' tali awżiljarji għandha tkun minimizzata, imma fl-ebda każ m'għandha teċċedi 100 mg kull litru fil-medja tat-test.

It-test għandu jkun imwettaq mingħajr l-aġġustament tal-pH. Jekk ikun hemm evidenza ta' tibdil qawwi fil-pH, huwa rakkomandat li t-test għandu jkun repetut bi pH aġġustat u r-rizultati inkluzu fir-rapport. F'dak il-każ, il-valur tal-pH tat-tahlita bil-lest għandu jkun aġġustat għall-valur tal-pH ta' l-ilma tat-tahlit, sakemm ma jkunx hekk raġunijiet speċifiċi il-ghala dan m'għandux isir. HCl u NaOH huma preferuti għal dan l-iskop. Dan l-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod hekk li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tahlita bil-lest ma tkunx mibdula sa xi medda sinifikanti. Jekk ikun hemm xi reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni fizika tal-kompost tat-test ikkaġunata bl-aġġustament, dan għandu jkun mistqarr.

1.6.1.2. *Ilma taż-żamma u tat-trattib*

Forniment ta' ilma tax-xorb (mhux kontaminat b'konċentrazzjonijiet potenzjalment ta' hsara mill-klorin, metalli tqal jew sustanzi oħrajn), ilma naturali ta kwalità tajba jew ilma rikostitwita (ara l-Appendiċi I) jista jkun użat. Ilmijiet b'ebusija totali ta' bejn 10 u 250 mg kull litru (bħala CaCO_3) u bi pH minn 6,0 sa 8,5 huma preferuti.

1.6.2. **Apparat**

L-apparat kollu għandu jkun magħmul minn materjal kemikalment inert.

— sistema ta' tahlil awtomatiku (għal test b'ċaqleq kontinwu),

— arloġġ ta' l-ossigenu,

— apparat għad-determinazzjoni ta' l-ebusija ta' l-ilma,

— apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura,

— arloġġ pH.

1.6.3. **Ħut tat-test**

Il-ħut għandu jkun f'kondizzjoni tajba tas-saħħa u ħieles minn xi malformazzjoni apparenti.

▼B

L-ispeċi użati għandhom ikunu magħżula fuq il-bażi ta' kriterja pratika, bħalma hija d-disponibbiltà faċli tagħhom matul is-sena, l-faċilità tal-manutenzjoni, l-konvenjenza għat-testijiet, is-sensittività relativa għall-kimika u xi fatturi ekonomiċi, bioloġiċi u ekoloġiċi li jistgħu jaffettwaw ir-riżultati. Il-htieġa tal-kompattibbiltà tad-data akkwistat u l-armonizzazzjoni internazzjonali eżistenti (referenza 1) għandha wkoll tkun imfakkra meta ssir l-għażla tal-ispeċi tal-ħut.

Lista tal-ispeċi tal-ħut li huma rakkommandati għat-twettieq ta' dan it-test hija mogħtija fl-Appendiċi 2; il-ħut irrigat (taż-żebra) u t-trotta ikkulurita huma l-ispeċi preferuti.

1.6.3.1. *Iż-zamma*

Il-ħut tat-test preferibbilment jiġu minn lott wiehed ta' l-istess tul u età. Il-ħut għandu jinżamm għal mill-anqas 12-il jum, fil-kondizzjonijiet kif ġejjin:

tagħbija:

xierqa għas-sistema (riċirkolazzjoni jew kurrent kontinwu) u l-ispeċi tal-ħut,

l-ilma:

ara 1.6.1.2,

dawl:

12 sa 16-il siegħa ta' dawl kuljum,

konċentrazzjoni ta' ossiġenu mdewweb:

mill-anqas 80 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja,

ikel:

tlett darbiet fil-ġimġha jew kull jum, jieqaf 24 siegħa qabel il-bidu tat-test.

1.6.3.2. *Mortalità*

B'segwiment tal-perijodu ta' 48 siegħa sakem joqghodu, il-mortalitajiet huma reġistrati u din il-kriterja li ġejja għandha tkun applikata:

— aktar minn 10 % tal-popolazzjoni matul sebat ijiem:

ċaħda tal-lott kollu kemm hu,

— bejn 5 u 15 % tal-popolazzjoni:

perijodu taż-zamma ikompli għal sebat ijiem addizzjonali.

Jekk l-ebda mortalità ma sseħh, il-lott huwa aċċettabbli, altrimenri għandu jkun miċhud,

— anqas minn 5 % tal-popolazzjoni:

aċċettazzjoni tal-lott.

1.6.4. *Adattazzjoni*

Il-ħut kollu għandu jkun espost għall-ilma tal-kwalità u tat-temperatura li jkunu wżati fit-test għal mill-anqas sebat ijiem qabel ma jintużaw.

▼B

1.6.5. **Proċedura tat-test**

Test tas-sejba tal-medda jista jippreċedi t-test definittiv, sabiex tkun akkwistata l-informazzjoni dwar il-medda tal-konċentrazzjonijiet li għandhom ikunu wżati fit-test ewlieni.

Kontroll wiehed minghajr is-sustanza tat-test għandu jkun magħmul u, jekk relevanti, kontroll wiehed li jkun fih sustanza awżiljarja għandu wkoll ikun magħmul, b'żieda mas-serje tat-testijiet.

Jiddependi mill-proprietajiet fiżiċi u kimiċi tal-kompost tat-test, test statiku, semi-statiku jew biċ-ċaqlieq kontinwu għandu jkun magħżul skond kif xieraq, sabiex iwettaq il-kriterja tal-kwalità.

Il-ħut huwa espost għas-sustanza kif deskritt hawn taht:

- tul ta' żmien: 96 siegħa
- numru ta' l-annimali: mill-anqas 7 kull konċentrazzjoni,
- tankijiet: ta' daqs adattat b'relazzjoni mat-tagħbija rakkommandata,
- tagħbija: tagħbija massima ta' 1 g kull litru għal testijiet statiki u semi-statiki hija rakkommandata; għal sistemi ta' ċaqlieq kontinwu, tagħbija għola hija aċċettabbli
- konċentrazzjoni tat-test: Mill-anqas ħames konċentrazzjoninijiet li jiddifferixxu b'fattur kostanti li ma jeċċedix 2,2 u kemm jista jkun possibbli li jkopri l-medda ta' 0 sa 100 % mortalità.
- ilma: ara 1.6.1.2,
- dawl: 12 sa 16-il siegħa ta' dawl kuljum,
- temperatura: xierqa għall-ispeċi (l-Appendiċi 2) imma fi hdan ± 1 °C skond it-test partikolari,
- konċentrazzjoni ta' ossiġenu mdewweb: mhux anqas minn 60 % tal-valur tas-saturazzjoni ta' l-arja fit-temperatura magħżula,
- ikel: xejn.

Il-ħut ikunu spezzjonati wara l-ewwel 2 sa 4 siegħat u mill-anqas matul intervalli ta' 24 siegħa. Il-ħut huma meqjusa bħala mejta jekk meta jkunu minsusa fil-pedunkula kawdjali ma jipproduċu l-ebda reazzjoni u l-ebda movimenti tan-nifs ma jkunu vizibbli. Il-ħut mejta jkunu mnehhija malli dan ikun osservat u l-mortalitajiet huma reġistrati. Reġistri jinżammu ta' annormalitajiet vizibbli (eż. talf ta' l-ekwilibriju, tibdil fl-imġieba ta' l-ġhawm, funzjoni respiratorja, pigmentazzjoni, eċċ.).

Il-kejl tal-pH, l-ossiġenu mdewweb u tat-temperatura għandhom jitwettqu ta' kuljum.

Test ta' limitazzjoni

Bl-użu tal-proċeduri deskritti f'dan il-metodu tat-test, test tal-limitazzjoni jista jkun imwettaq fi 100 mg kull litru sabiex ikun muri li l-LC₅₀ ikun akbar minn din il-konċentrazzjoni.

Jekk in-natura tas-sustanza tkun tali li konċentrazzjoni ta' 100 mg kull litru fl-ima tat-test ma tistax tkun milhuqha, it-test tal-limitazzjoni għandu jkun imwettaq f'konċentrazzjoni egwali għas-solubilità tas-sustanza (jew tal-konċentrazzjoni massima li tiffirma tixrid stabbli) fil-medja użata (ara wkoll il-punt 1.6.1.1).

▼B

It-test tal-limitazzjoni għandu jkun imwettaq bl-użu ta' minn 7 sa 10 hutiet, bl-istess numru ta' kontroll(i). (It-teorija binominali tiddetta li meta 10 hutiet huma wżati b'mortalità żero, ikun hemm 99,9 % affidabbilità li l-LC₅₀ huwa akbar mill-konċentrazzjonini użata f'dak it-test tal-limitazzjoni. Bi 7, 8 jew 8 hutiet, l-assenza tal-mortalità tipprovdi mill-anqas 99 % affidabbilità li l-LC₅₀ huwa akbar mill-konċentrazzjonini użata.)

Jekk ikun hemm mortalijiet, studju shih għandu jkun imwettaq. Jekk effetti sub-letali huma osservati, dawn għandhom ikunu reġistrati.

2. DATA U EVALWAZZJONI

Għal kull perijodu ta' meta l-osservazzjonijiet kienu reġistrati (24, 48, 72 u 96 siegħa), pingi l-persentaġġ tal-mortalità għal kull perijodu ta' l-espożizzjoni kif rakkommandat kontra l-konċentrazzjoni fuq karta tal-probabbiltà logaritmika,

Meta possibbli u għal hin ta' l-osservazzjoni, l-LC₅₀ u l-limiti tal-kunfidenza ($p = 0,05$) għandhom ikunu ikkalkolati bl-użu tal-proċeduri normali; dawn il-valuri għandhom ikunu mqarriba lejn wiehed, l-aktar lejn tnejn, figuri sinifikanti (eżempji tat-tqarrib lejn żewġ figuri: 170 għal 173,5; 0,13 għal 0,127; 1,2 għal 1,21).

F'dawk il-każi meta l-linja magħwġa bil-kurva tal-konċentrazzjoni/-persentaġġ tar-reazzjoni tkun wieqfa wisq sabiex tippermetti l-kalkolazzjoni tal-LC₅₀, estimi grafiċi ta' dan il-valur huma suffiċjenti.

Meta żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi, b'relattività ta' 2,2 jagħtu biss 0 u 100 % mortalità, dawn iż-żewġ valuri huma suffiċjenti sabiex jindikaw il-medda li fiha jkun jidhol il-LC₅₀.

Jekk ikun osservat li l-istabbiltà jew l-omoġenità tas-sustanza tat-test ma jistghux jinzzammu dan għandu jkun irrapportat u qies għandu jittiehed fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

3. RAPPORTAĠĠ

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

- informazzjoni dwar il-hut tat-test (isem xjentifiku, razza, fornitur, xi pre-trattament, daqs u numru użat f'kull konċentrazzjoni tat-test);
- is-sorsi tat-trattib – ilma u l-karatteristiċi kimiċi magħgħuri (pH, ebusija, temperatura);
- fil-każ ta' sustanza b'solubilità akwea baxxa, l-metodu tal-preparazzjoni tat-tahlitiet kemm dawk imhejjija lesti u tat-test;
- konċentrazzjoni ta' xi sustanzi awżiljarji;
- lista tal-konċentrazzjonijiet użati u xi informazzjoni disponibbli dwar l-istabbiltà tal-konċentrazzjonijiet tal-kimika ittestjata fit-tahlita tat-test;
- jekk analizi kimika titwettaq, metodi wżati u r-riżultati akkwistati;
- r-riżultati tat-test tal-limitazzjoni, jew imwettaq;
- ir-raġunijiet tal-ghażla u d-dettalji tal-proċedura tat-test kif użata (eż. statiku, semi-statiku, rata tad-dożar, rata taċ-ċaqlieq kontinwu, jekk huma mogħti l-arja, t-tagħbija tal-hut, eċċ.);

▼B

- deskrizzjoni ta' l-apparat tat-test;
- l-organizzazzjoni tad-dawl;
- il-konċentrazzjonijiet ta' l-ossigenu mdewweb, il-valuri pH u t-temperaturi tat-taħlitiet tat-test kull 24 siegħa;
- evidenza tal-kriterja tal-kwalità li tkun giet imwettqa;
- tabella li turi il-mortalità kumulattiva ta' kull konċentrazzjoni u l-kontroll (u l-kontroll bis-sustanza awżiljarja, jekk mehtieg) f'kull wiehed mill-hinijiet rakkommandati ta' l-osservazzjoni;
- grafika tal-konċentrazzjoni/persentaġġ tal-kurva tar-reazzjoni fit-tmiem ta' kull test;
- jekk possibbli, l-valuri LC_{50} f'kull wiehed mill-hinijiet rakkommandati ta' l-osservazzjoni (bi 95 % tal-limiti ta' l-affidabbiltà);
- proċedura statistiċi wżati għad-determinazzjoni tal-valuri LC_{50} ;
- jekk tkun użata sustanza ta' referenza, r-riżultati akkwistati,
- l-ogħla konċentrazzjoni tat-test li ma tohloq l-ebda mortalità matul il-perijodu tat-test;
- l-anqas konċentrazzjoni tat-test li tohloq 100 % mortalità matul il-perijodu tat-test.

4. REFERENZI

- (1) OECD, Pariġi, 1981, Linji ta' Gwida tat-Testijiet 203, Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali u aġġornamenti.
- (2) AFNOR – Determinazzjoni tat-tossicità akuta ta' sustanza mal-Brachydanio rerio -Metodi Statiċi u ta' Caqlieq Kontinwu – NFT 90-303 Ġunju 1985.
- (3) AFNOR – Determinazzjoni tat-tossicità akuta ta' sustanza mal-Salmo gairdneri -Metodu Statiku – ta' Caqlieq Kontinwu – NFT 90-305 Ġunju 1985
- (4) ISO 7346/1/2 u/3 – Kwalità ta' l-ilma – Determinazzjoni tat-tossicità letali akuta ta' sustanzi għall-hut ta' l-ilma frisk (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Parti 1: Metodu statiku. Parti 2: Metodu semi-statiku. Parti 3: Metodu biċ-ċaqlieq kontinwu.
- (5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.
- (6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).
- (7) JIS K 0102, Test tat-tossicità akuta għall-hut.
- (8) NEN 6506 – Ilma – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980.
- (9) Aġenzija tal-Harsien Ambjentali, Metodi għal testijiet tat-tossicità akuta mal-hut, makroinvertebrati u amfibji. Il-Kumitat dwar il-Metodi għat-Testijiet tat-Tossicità ma l-Organizmi Akwatiċi, Serje tar-Riċerka Ekoloġika EPA-660-75-009, 1975.
- (10) Aġenzija tal-Harsien Ambjentali, Laboratorju tal-monitaraġġ u sostenn ambjentali, Uffiċju tar-Riċerka u Żvilupp, EPA-600/4-78-012, Jannar 1978.

▼B

- (11) Aġenzija tal-Harsien Ambjentali, Kontroll tas-Sustanza Tossika, Parti IV, 16 ta' Marzu 1979.
- (12) Metodi normali għall-eżaminazzjoni ta' l-ilma u l-ilma skartat, l-erbatax edizzjoni, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- (13) Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej, Programm tat-test Inter-Laboratorju li jikkonċerna l-istudju ta' l-ekotossicità ta' sustanza kimika fir-rigward tal-ħut. Studju KEE D.8368, 22 Marzu 1979.
- (14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (15) Litchfield, J.T. u Wilcoxon, F., Metodu simplifikat għall-evalwazzjoni ta' l-esperimenti ta' l-effetti tad-doża, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.
- (16) Finney, D.J. Metodi Statistiċi fl-Assaġġ Bioloġiku. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- (17) Sprague, J.B. Kejl tat-tossicità tat-tniġġis għall-ħut. Metodi tal-Bioassaġġ għal tossicità akuta. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- (18) Sprague, J.B. Kejl tat-tossicità tat-tniġġis għall-ħut. II L-utilizzazzjoni u l-applikar tar-riżultati tal-bioassaġġ. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.
- (19) Stephan, C.E. Metodi għal kalkolazzjoni ta' LC₅₀. FI-Evalwazzjoni tat-Tossikoloġija u l-Periklu Akwatiku (bl-edizzjoni ta' F.I. Mayer u J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- (20) Stephan, °C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. u Andrews, R.W. Programm tal-computer għal kalkolazzjoni ta' LC50. US EPA.



Appendiċi 1

Ilma rikostitwit

Eżempju ta' trattib xieraq ta' l-ilma

Il-kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

L-ilma għandu jkun distillat ta' kwalità tajba, jew ilma dejonizzat b'konduktività ta' anqas minn $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Apparat għad-distillazzjoni ta' l-ilma m'għandux ikun fih xi partijiet magħmula mir-ramm.

Tahlitiet bil-lest

CaCl_2 . (Dihidrat tal-klorid tal-kalċju): 11,76 g

Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.

MgSO_4 . (heptaidrat tas-sulfat tal-magneżju): 4,93 g

Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.

NaHCO_3 NaHCO_3 (karbonat ta' l-idroġenu tas-sodju): 2,59 g

Dewweb fi, fl-ilma u wassal għal litru bl-ilma.

KCl (klorid tal-putassa): 0,23 g

Dewweb fi, u wassal għal litru bl-ilma.

Ilma rikostitwit għat-tidwib

Hawwad 25 ml ta' kull wiehed ta' l-erba tahlitiet bil-lest u wassal sa litru bl-ilma.

Qawwi bl-arja sakemm il-konċentrazzjonini ta' l-ossiġenu mdewweb tkun egwali għall-valur tas-saturizzazzjoni ta' l-arja.

Il-pH għandu jkun $7,8 \pm 0,2$.

Jekk meħtieġ, aġġusta il-pH bi NaOH (idrossidu tas-sodju) jew HCl (aċidu idrokloriku).

L-ilma tat-trattib hekk ippreparat huwa mwarra għal madwar 12-il siegħa u l-ebda arja aktar ma tkun miżjuda.

Is-somma tal-jonji Ca u Mg f'din it-tahlita hija ta' 2,5 mmol kull litru. Ir-relattività tal-jonji Ca:Mg hija 4:1 u tal-joni Na:K hija 10:1. L-alkalinità totali ta' din it-tahlita hija 0,8 mmol kull litru.

Kwalunkwe devjazzjoni fil-preparazzjoni ta' l-ilma tat-trattib m'għandhiex tibdel il-komposizzjoni jew il-proporzjonijiet ta' l-ilma.



Appendiċi 2:

Speċi ta' hut rakkommandat għat-testijiet

Speċje rakkommandati	Medda rakkommandata tat-Temperatura tat-Test (°C)	Tul total rakkommandat ta' l-annimal tat-test (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Hut-Zebrab	20 sa 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow (hut ta' l-ilma helu)	20 sa 24	5,0 ± 2,5
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Karpjun komuni	20 sa 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850) Killifish hamrani	20 sa 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 sa 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Bluegill	20 sa 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Trota kulurita	12 sa 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Orfe dehbi	20 sa 24	6,0 ± 2,0

Ġabra

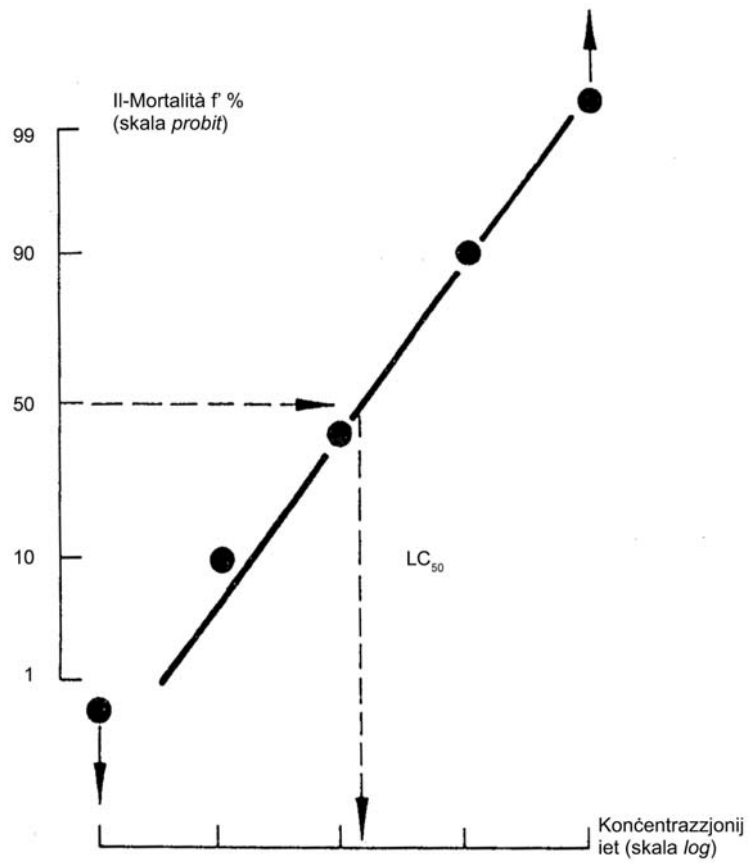
Il-hut elenkat hawn fuq huma faċli sabiex jitkabbru u/jew faċilment disponibbli matul is-sena kollha. Dawn jistghu ikunu mkabbra u ikkultivati jew fl-irzizet tal-hut jew fil-laboratorju, f'kondizzjonijiet ikkontrollati dwar il-mard u l-parassiti, hekk li l-annimal tat-test ikunu b'saħħtu u ta' nisel magħruf. Dan il-hut huwa disponibbli f'hafna partijiet tad-dinja.

▼ B

Appendiċi 3

Eżempju tal-konċentrazzjonini: persentaġġ tal-mortalità

Eżempju tad-determinazzjoni ta' LC_{50} bl-użu tal-karta *log-probit*



▼B**C.2. IT-TEST TA' L-IMMOBILIZZAZZJONI AKUTA *DAPHNIA SP.*****1. METODU**

Dan il-metodu tat-test ta' immobilizzazzjoni akuta huwa ekwivalenti għall-OECD TG 202 (2004).

1.1. DAHLA

Dan il-metodu jiddeskrivi test ta' tossiċità akuta biex jiġu stmati l-effetti tal-kimiċi ta' lejn id-dafnidi. Intużaw metodi tat-test eżistenti safejn possibbli (1)(2)(3).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Fil-kuntest ta' dan il-metodu, jintużaw dawn id-definizzjonijiet li ġejjin:

EC₅₀: hija l-konċentrazzjoni stmata li timmobilizza 50 % tad-dafnidi f'perjodu ta' espożizzjoni dikjarat. Jekk tintuża definizzjoni ohra, din għandha tiġi rrapportata, flimkien mar-riferenzi tagħha.

Immobilizzazzjoni: Dawk l-annimali li huma li ma jistgħux jgħumu fi żmien 15-il sekonda, wara aġitazzjoni bil-mod tal-kontenitur tat-test jitqiesu li huma immobilizzati (ukoll jekk għadhom jistgħu jċaqalqu l-antenni tagħhom).

1.3. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Dafnidi żgħar, ta' età ta' inqas minn 24 siegħa fil-bidu tat-test, huma esposti għas-sustanza tat-test f'varjetà ta' konċentrazzjonijiet għal perjodu ta' 48 siegħa. L-immobilizzazzjoni hija rrekordjata ma' l-24 siegħa u mat-48 siegħa u mqabbla mal-valuri tal-kontroll. Ir-riżultati huma analizzati sabiex jiġi kkalkolat l-EC₅₀ fit-48 siegħa (ara t-taqsima 1.2 għad-definizzjonijiet). Id-determinazzjoni ta' l-EC₅₀ fl-24 siegħa mhijiex obbligatorja.

1.4. L-INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Is-solubbiltà fl-imla u l-prensa tal-fwar tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufa u għandu jkunu disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fit-tahlitiet tat-test b'effiċjenza ta' l-irkupru rrapportata, u limitu tad-determinazzjoni. Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza, l-istabbiltà fl-ilma jew fid-dawl, P_{ow} u r-riżultati ta' test għall-bijodegradabbiltà lesta (ara l-metodu C.4).

Nota: Il-gwida għall-ittestjar ta' sustanzi bil-kwalitajiet fiżiċi kimiċi li għamluhom diffiċli li jiġu ttestjati hija pprovduta f' (4).

1.5. IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA

Sustanza ta' riferenza tista' tiġi ttestjata għal EC₅₀ bħala mezz biex jiġi żgurat li l-kondizzjonijiet tat-test huma affidabbli. It-tossikanti użati fit-testijiet-ċirku internazzjonali (1)(5) huma rrakkomandati għal dan l-ghan⁽¹⁾. It-test(ijiet) b'sustanza ta' riferenza għandhom preferibbilment isiru kull xahar u għall-inqas darbtejn fis-sena.

⁽¹⁾ Ir-riżultati ta' dawn it-testijiet inter-laboratorji u Korrigendum Tekniku għall-ISO 6341 jagħtu EC₅₀ – 24 h tad-dikromat tal-potassju (K₂Cr₂O₇) fil-firxa bejn 0,6 mg/l u 1,7 mg/l.

▼B**1.6 IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ**

Biex test ikun validu, jghoddu dawn il-kriterji operattivi:

- Fil-kontrolli, inkluz il-kontroll li fih l-aġent li jholl, mhux aktar minn 10 % tad-dafnidi għandhom ikunu ġew immobilizzati;
- Il-koncentrazzjoni ta' l-ossigenu mahlul fl-aħħar tat-test għandha tkun ≥ 3 mg/l fil-kontenituri tal-kontroll u tat-test.

Nota: Għall-ewwel kriterju, mhux aktar minn 10 % tad-dafnidi tal-kontroll għandhom juru immobilizzazzjoni jew sinjali oħra ta' mard jew stress, per eżempju, diskolorazzjoni, mġiba mhux normali bhal li jinqabdu f'wiċċ l-ilma.

1.7 DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**1.7.1 L-Apparat**

Il-kontenitur tat-test u apparat ieħor li se jiġi f'kuntatt mat-taħlitiet tat-test għandhom ikunu magħmula għal kollox mill-ħġieġ jew minn materjal ieħor li huwa kimikament inert. Il-kontenituri tat-test normalment ikunu tubi tat-test tal-ħġieġ jew tazzi biż-żennuna; għandhom jitnaddfu qabel kull użu bl-użu ta' proċeduri standard tal-laboratorju. Il-kontenituri tat-test għandhom ikunu koperti ħafif biex jitnaqqas it-telf ta' l-ilma minhabba evaporazzjoni u biex jiġi evitat id-dhul tat-trab fit-taħlitiet. Is-sustanzi volatili għandhom l-ewwel jiġu ttestjati f'kontenituri magħluqin li huma mimlijin sa fuq, u li huma kbar biżżejjed biex jiġi prevenut li l-ossigenu jibda jillimita jew ikun baxx wisq (ara t-taqsima 1.6 u l-ewwel paragrafu tat-taqsima 1.8.3).

Barra minn dan, jintuza xi ftit mit-tagħmir li ġej jew kollu: miter ta' l-ossigenu (b'mikroelektrodu jew tagħmir ieħor xieraq biex jitkejjel l-ossigenu f'kampjuni b'volumi baxxi); miter tal-pH; apparat xieraq għall-kontroll tat-temperatura; tagħmir għad-determinazzjoni tal-koncentrazzjoni totali tal-karbonu organiku (TOC – *total organic carbon concentration*); tagħmir għad-determinazzjoni tat-talba ta' l-ossigenu kimiku (COD – *chemical oxygen demand*); tagħmir għad-determinazzjoni ta' l-ebusija, eċċ.

1.7.2 L-organizmu tat-test

Daphnia magna Straus hija l-ispeċje preferuta tat-test għalkemm speċje oħrajn *Daphnia* xierqa jistgħu jintużaw f'dan it-test (eż. *Daphnia pulex*). Fil-bidu tat-test, l-animali għandu jkollhom inqas minn 24 siegħa u biex titnaqqas il-varjabbiltà, huwa rakkomandat bis-saħħa li ma jkunux l-ewwel friegħ tat-tifqisa. Għandhom ikunu derivati minn tifqisa b'saħħitha (jiġifieri ma juru l-ebda sinjali ta' stress bħall-mortalità għolja, il-preżenza ta' maskili u ephippia, dewmien fil-produzzjoni ta' l-ewwel tifqisa, animali li jmurilhom il-kulur, eċċ.). L-organizmu kollha użati għal test partikolari għandhom ikunu oriġinaw mill-istess tifqisa ta' dafnidi. L-animali tat-tifqisa għandhom jinżammu fil-kondizzjonijiet tal-kultura (dawl, temperatura, medju) simili għal dawk li għandhom jintużaw fit-test. Jekk il-mezz tal-kultura tad-dafnidi li għandu jintuza fit-test huwa differenti minn dak użat għall-kultura rutina tad-dafnidi, hija Prattika tajba li jiġi inkluz test ta' l-akklimatizzazzjoni ta' qabel it-test. Għal dak, id-dafnidi tat-tifqisa għandhom jinżammu fl-ilma tat-taħlit fit-temperatura tat-test għal mhux inqas minn 48 siegħa qabel il-bidu tat-test.



1.7.3. L-ilma taż-żamma u tat-tahlit

L-ilma naturali (l-ilma tal-wiċċ u ta' l-art), l-ilma rikostitwit jew ilma tal-vit deklorat huma aċċettabbli bħala ilma taż-żamma u tat-tahlit jekk id-dafnidi jissopravvivu fihom għal kemm idum il-kulturarazzjoni, l-akklimatizzazzjoni jew l-ittestjar minghajr ma jintwerew sinjal ta' stress. Kwalunkwe ilma li jikkonforma mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma tat-tahlit aċċettabbli kif elenkat fl-Anness 1 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. L-ilma rikostitwit jista' jsir biż-żjeda ta' ammonti speċifiċi ta' reaġenti ta' grad analitiku maghruf għal ilma deonizzat jew distillat. Eżempji ta' ilma rikostitwit jingħataw f'(1) (6) u fl-Anness 2. Innota li l-medja li fihom aġenti li jikkombinaw jonu tal-metall ma' kompost kimiku (*chelating agent*), bħall-medji M4 u M7 fl-Anness 2, għandhom jiġu evitati sustanzi tat-test li fihom il-metalli. Il-pH għandu jkun fil-firxa ta' 6 sa 9. Hija rrakkomandata l-ebusija bejn 140 u 250 mg/l (bħala CaCO₃) għal *Daphnia Magna*, filwaqt li tista' wkoll tkun xierqa ebusija inqas għal speċje oħrajn ta' *Daphnia*. L-ilma tat-tahlit jista' jiġi arjat qabel ma jintuża għat-test sabiex il-koncentrazzjoni ta' l-ossigenu mħallat tkun laqhet is-saturazzjoni.

Jekk jintuża l-ilma naturali, il-parametri tal-kwalità għandhom jitkejlu għall-inqas darbtejn fis-sena jew kull meta huwa ssuspettat li dawn il-karatteristiċi setghu nbidlu b'mod sinjifikanti (ara l-paragrafu ta' qabel u l-Anness 1). Il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) għandu jsir ukoll. Jekk jintuża ilma tal-vit deklorat, l-analiżi kuljum tal-klorin hija mixtieqa. JEkk l-ilma tat-tahlit huwa minn għajn ta' l-ilma fil-wiċċ jew fl-art, għandhom jitkejlu l-konduttività u l-karbonu organiku totali (TOC) jew it-talba għall-ossigenu kimiku (COD).

1.7.4. It-tahlitiet tat-test

It-tahlitiet tat-test tal-koncentrazzjonijiet magħżula normalment huma ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ta' stokk. Is-soluzzjonijiet ta' stokk preferibbilment għandhom jiġu ppreparati billi s-sustanza tat-test tinhall fl-ilma tat-tahlit. Sa fejn huwa possibbli, l-użu tas-solventi, l-emulsifikanti jew id-dispersanti għandu jiġi evitat. Madankollu, dawn il-komposti jistgħu jkunu meħtieġa f'xi każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ta' stokk li hija kkoncentrata kif xieraq. Il-gwida dwar solventi, emulsifikanti u d-dispersanti xierqa tingħata f' (4). Fi kwalunkwe każ is-sustanza tat-test fit-tahlitiet tat-test m'għandhiex teċċedi l-limitu ta' solubbiltà fl-ilma tat-tahlita.

It-test għandu jsir minghajr l-aġġustament tal-pH. Jekk il-pH ma jibqax fil-firxa 6 – 9, imbagħad jista' jsir test ieħor, bl-aġġustament tal-pH tas-soluzzjoni ta' stokk skond dak ta' l-ilma tat-tahlit qabel ma tiżdied is-sustanza tat-test. L-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod li l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni ta' stokk ma tinbidilx sa livell sinjifikanti u li ma tiġi kkaużata ebda reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni tas-sustanza tat-test. Huma ppreferuti HCl u NaOH.

▼B**1.8 IL-PROCEDURA****1.8.1. Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni****1.8.1.1. Il-gruppi tat-test u l-kontrolli**

Il-kontenituri tat-test jintlew bil-volumi xierqa ta' l-ilma tat-tahlit u t-tahlitiet tas-sustanza tat-test. Il-proporzjon tal-volum ta' arja/ilma għandha tkun identika għall-grupp tat-test u tal-kontroll. Imbagħad id-dafnidi jitqiegħdu fil-kontenituri tat-test. Għall-inqas 20 annimal, preferibbilment maqsuma f'erba' gruppi ta' hames annimali kull wiehied, għandhom jintużaw għal kull konċentrazzjoni tat-test (jiġi-fieri volum ta' 10 ml għal hames dafnidi għal kull vettura tat-test). It-test jista' jsir bl-użu ta' tiġdid semi-statiku jew sistema ta' flow-through meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test mhijiex stabbli.

Serje ta' kontroll wahda ta' l-ilma ta' dilwizzjoni kif wkoll, jekk rilevanti, serje ta' kontroll wahda li fiha l-aġent solubilizzanti għandhom isiru flimkien mas-serje tat-trattament.

1.8.1.2. Il-konċentrazzjonijiet tat-test

Jista' jsir test biex tinsab il-firxa sabiex tiġi ddeterminata l-firxa ta' konċentrazzjonijiet għat-test definittiv kemm-il darba ma tkunx disponibbli l-informazzjoni dwar it-tossicità tas-sustanza tat-test. Għal dan l-ghan, id-dafnidi huma esposti għal serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati hafna tas-sustanza tat-test. Hames dafnidi għandhom jiġu esposti għal kull konċentrazzjoni tat-test għal 48 siegħa jew inqas, u ma huma neċessarji ebda replikati. Il-perjodu ta' espożizzjoni jista' jitqassar (eż. 24 siegħa jew inqas) jekk id-data xierqa għall-ghan tat-test biex tinsab il-firxa tista' tinkiseb f'inqas żmien.

Għandhom jintużaw għall-inqas hames konċentrazzjonijiet tat-test. Għandhom jiġu rranġati f'serje ġeometriċi b'fattur ta' separazzjoni li preferibbilment ma jeċċedix 2,2. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn hames konċentrazzjonijiet. L-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha preferibbilment tirriżulta fl-immobilizzazzjoni ta' 100 fil-mija, u l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa ttestjata għandha preferibbilment ma tagħti ebda effett osservabbli.

1.8.1.3. Il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni

It-temperatura għandha tkun bejn 18 °C u 22 °C, u għal kull test uniku għandha tkun kostanti sa ± 1 °C. Huwa rakkomandat ċiklu ta' 16-il siegħa dawl u 8 sigħat dlam. Huwa aċċettabbli wkoll id-dlam totali, speċjalment għas-sustanzi tat-test li mhumiex stabbli fid-dawl. Il-kontenituri tat-test m'għandhomx jiġu arjati matul it-test.

It-test isir mingħajr aġġustament tal-pH. Id-dafnidi m'għandhomx jiġu mitmugħa matul it-test.

1.8.1.4. Kemm idum it-test

It-test idum 48 siegħa.

1.8.2. Osservazzjonijiet

Kull kontenitur tat-test għandu jiġi vverifikat għal dafnidi immobilizzati fl-24 u fit-24 siegħa wara l-bidu tat-test. (ara t-taqsima 1,2 għad-definizzjonijiet). Minbarra l-immobilità, kwalunkwe mġieba jew dehra mhux normali għandha tiġi rrapportata.

▼B**1.8.3. Kejl analitiku**

L-ossigñu imhallat u l-pH jiġu mkejla fil-bidu u fl-aħħar tat-test fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza. Il-konċentrazzjoni ta' l-ossigñu mahlul fil-kontrolli għandha tkun skond il-kriterji tal-validità (ara t-taqsima 1.6). Il-pH normalment m'għandux ivarja b'aktar minn 1.5 unitajiet fi kwalunkwe test. Normalment it-temperatura tiġi mkejla fil-kontenituri tal-kontroll jew fl-arja ta' l-ambjent u preferibbilment għandha tiġi rreġistrata kontinwament matul it-test, jew, bħala minimu, fil-bidu u fl-aħħar tat-test.

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tiġi mkejla mhux inqas minn fl-ogħla konċentrazzjoni tat-test u f'dik l-aktar baxxa, fil-bidu u fl-aħħar tat-test (4). Huwa rakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Izda, jekk hemm provi li juru li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test inżammet b'mod sodisfaċenti bejn $\pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-bidu matul it-test kollu, ir-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri mkejla nominali jew tal-bidu.

1.9 IT-TEST TAL-LIMITU

Bl-użu tal-proċeduri deskritti f'dan il-Metodu, jista' jsir test tal-limitu b'100 mg/l sustanza tat-test jew sa l-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-mezz tat-test (dak li huwa l-aktar baxx fosthom) sabiex jintwera li l-EC₅₀ huwa akbar minn din il-konċentrazzjoni. It-test tal-limitu għandu jsir bl-użu ta' 20 dafnida (preferibbilment maqsuma f'erba' gruppi ta' hamsa), bl-istess numru fil-kontroll(i). Jekk issehh immobilizzazzjoni, għandu jsir studju shih. Għandha tiġi rrekordjata kwalunkwe mġieba osservata li mhijiex normali.

2. DATA

Id-data għandha tiġi mqassra f'forma tabulari, li turi għal kull grupp ta' trattament u l-kontroll, l-għadd ta' dafnidi użati, l-immobilizzazzjoni f'kull osservazzjoni. Il-persentaġġ immobilizzati fl-24 siegħa u fit-48 siegħa huma mpingija fuq djiagramma kontra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Id-data hija analizzata permezz ta' metodi statistiċi xierqa. (eż. analizi *probit*, eċċ.) biex jiġu kkalkolati l-gradjenti tal-kurvi ta' l-EC₅₀ b'limiti ta' kunfidenza ta' 95 % ($p = 0,05$) (7) (8).

Fejn il-metodi standard biex jinħadem l-EC₅₀, ma jgħoddux għad-data miksuba, l-ogħla konċentrazzjoni li ma tikkaġuna ebda immobilità u l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tipproduċi immobilità ta' 100 % għandhom jintużaw bħala approssimazzjoni għall-EC₅₀ (għaliex dan huwa l-medju ġeometriku ta' dawn iż-żewġ konċentrazzjonijiet).

3. L-IRRAPPOR TAR**3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST**

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

Is-sustanza tat-test:

— in-natura fizika u l-karatteristiċi fiżiċi-kimiċi;

▼B

— data ta' l-identifikazzjoni kimika, inkluża l-purità.

L-ispeċje tat-test:

— l-ghajn u l-ispeċje tad-*Daphnia*, min jipprova l-ghajn (jekk magħruf) u l-kondizzjonijiet tal-kultura użati (inkluża l-ghajn, it-tip u l-ammont ta' l-ikel, il-frekwenza ta' l-ghalf).

Il-kondizzjonijiet tat-test:

— deskrizzjoni tal-kontenituri tat-test: tip ta' kontenituri, volum tat-tahlita, għadd ta' dafnidi għal kull kontenitur tat-test, għadd ta' kontenituri tat-test (replikati) għal kull konċentrazzjoni;

— metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ta' stokk u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew dispersanti, il-konċentrazzjonijiet użati;

— dettalji ta' l-ilma tat-tahlit: il-karatteristiċi tal-kwaliità ta' l-ghajn u ta' l-ilma (pH, ebusija, proporzjon Ca/Mg, proporzjon Na/K, alkalinità, konduttività, eċċ.);

— il-kompożizzjoni ta' l-ilma kkostitwit mill-ġdid jekk jintuża;

— il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni: it-temperatura, l-intensità u l-perjodiċità tad-dawl, l-ossigenu mahlul, il-pH, eċċ.

Riżultati:

— l-ghadd u l-persentaġġ ta' dafnidi li ġew immobilizzati jew li wrew xi effetti avversi (inkluża mġieba mhux normali) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament, f'kull hin ta' osservazzjoni u deskrizzjoni tan-natura ta' l-effetti osservati;

— ir-riżultati u d-data tat-test imwettaq bis-sustanza ta' riferenza, jekk disponibbli;

— il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test u r-riżultat ta' l-analiżi kollha biex tiġi ddeterminata s-sustanza tat-test fil-kontenituri tat-test; l-effiċjenza ta' l-irkupru u l-limitu tad-determinazzjoni għandhom ukoll jiġu rrapportati;

— il-kejl kollu fiżiku-kimiku tat-temperatura, tal-pH u ta' l-ossigenu mahlul li sar matul it-test;

— l-EC₅₀ fl-48 siegħa għall-immobilizzazzjoni b'intervalli ta' kunfidenza u graffs tal-mudell użat għall-kalkolu tagħhom, l-angolatura tal-kurvi tad-dożi ta' rispons u l-iżball standard tagħhom; il-proċeduri statistiċi użati għad-determinazzjoni ta' l-EC₅₀; (dawn l-elementi ta' data għall-immobilizzazzjoni fl-24 siegħa għandhom jiġu rrapportati wkoll meta jkunu tkejlu)

— spjegazzjoni ta' kwalunkwe devjazzjoni mill-Metodu tat-Test u jekk id-devjazzjoni affetwatx ir-riżultati tat-test.

4. REFERENZI

1. ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.
2. EPA OPPTS 850,1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter- laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*
6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.
7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 -American Society for Testing and Materials. Pp65-84
8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B*L-ANNESS I***XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAT-TAHLIT
AĊĊETTABBLI**

Sustanza	Konċentrazzjoni
Materja f'particelli	< 20 mg/l
Karbonu organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mingħajr ioni	< 1 µg/l
Klorin residwali	< 10 µg/l
Il-pestiċidji organofosfori totali	< 50 ng/l
Il-pestiċidji organofosfori totali flimkien ma' <i>polychlorinated biphenyls</i>	< 50 ng/l
Il-klorin organiku totali	< 25 ng/l



L-ANNESS 2

EŻEMPJI TA' IL-A TAT-TEST KOSTITWIT MILL-ĠDID XIERAQ

Ilma tat-test ISO (1)

Soluzzjonijiet ta' stokk (sustanza wahda)		Biex tipprepara l-ilma kkostitwit mill-ġdid, žid dawn il-volumi li ġejjin ta' tahlitiet tat-tifqisiet ma' litru ilma (*)
Sustanza	Ammont miżjud ma' litru ilma (*)	
Calcium chloride $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	11,76 g	25 ml
Sulfat tal-manjeżju $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	4,93 g	25 ml
Bikarnobat tas-sodju NaHCO_3	2,59 g	25 ml
Kloridu tal-potassju KCl	0,23 g	25 ml

(*) Ilma ta' safa xierqa, eż. deonizzat, distillat jew *reverse osmosis* b'kondottività li preferibbilment ma teċċedix $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Il-mezz Elendt M7 u M4

L-Akklimazzjoni għall-mezz Elendt M4 u M7

Xi laboratorji esperjenzaw diffikoltà biex jittrasferixxu direttament id-Daphnia għall-mezz M4 u M7. Madankollu, inkiseb xi suċċess bl-akklimazzjoni gradwali, jiġifieri li jiċċaqalqu mill-mezz tagħhom għal 30 % Elendt, u mbagħad għal 60 % Elendt u mbagħad għal 100 % Elendt. Jista' jkun li l-perjodi ta' akklimazzjoni jkunu jehtiegu li jkunu twal daqs xahar.

Il-preparazzjoni

Element traċċa

Soluzzjonijiet ta' stokk separati (I) ta' elementi traċċi individwali huma l-ewwel ippreparati f'ilma ta' safa xierqa, eż. deonizzat, distillat jew *reverse osmosis*. Minn dawn it-tahlitiet tat-tifqisiet differenti (I) tahlita tat-tifqisiet oħra (II) tiġi ppreparata, li jkun fiha l-elementi traċċi kollha (soluzzjoni kkombinata), jiġifieri:

Tahlita/i tat-tifqisa I (sustanza wahda)	Ammont miżjud ma' lima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Biex tipprepara s-soluzzjoni ta' stokk kkombinata II, žid dan l-ammont li ġej ta' soluzzjoni ta' stokk I ma' l-ilma (ml/l)	
			M4	M7
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	57 190	20 000- darba	1,0	0,25
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7 210	20 000- darba	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000- darba	1,0	0,25

▼B

Tahlita/i tat-tifqisa I (sustanza wahda)	Ammont miżjud ma' lima (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Biex tipprepara s-soluzzjoni ta' stokk kkombinata II, žid dan l-ammont li ġej ta' soluzzjoni ta' stokk I ma' l-ilma (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000- darba	1,0	0,25
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3 040	20 000- darba	1,0	0,25
NaBr	320	20 000- darba	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 230	20 000- darba	1,0	0,25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20 000- darba	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000- darba	1,0	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20 000- darba	1,0	1,0
KI	65	20 000- darba	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000- darba	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000- darba	1,0	1,0
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5 000	2 000- darba	—	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 991	2 000- darba	—	—

Kemm it-tahlitiet Na₂ EDTA u FeSO₄ huma ppreparati waħdehom, imferrghin flimkien u awtoklavati mill-ewwel.

Dan jagħti:

Tahlita 2 1 EDTA		1 000- darba	20,0	5,0

Mezzi M4 u M7

Il-mezzi M4 u M7 huma ppreparati bl-użu tas-soluzzjoni ta' stokk II, il-makro-nutrienti u l-vitamiini kif ġej:

	Ammont miżjud ma' l-ilma (mg/l)	Konċentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokk II miżjuda mal-mezz ippreparat (ml/l)	
			M4	M7
Soluzzjoni ta' stokk II (elementi traċċi kkombinati)		20-darba	50	50
Tahlitiet tat-tifqisa makro nutrienti (sustanza wahda)				
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1 000- darba	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	2 000- darba	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000- darba	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000- darba	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	5 000- darba	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000- darba	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000- darba	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000- darba	0,1	0,1

▼B

	Ammont miżjud ma' l-ilma (mg/l)	Koncentrazzjoni (relatata mal-mezz M4)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokk II miżjuda mal-mezz ippreparat (ml/l)	
			M4	M7
Taħlita ta' vitamini kkombinati	—	10 000- darba	0,1	0,1
It-taħlita ta' vitamini kkombinati hija ppreparata biż-żjeda tat-3 vitamini ma' litru ta' ilma, kif jidher hawn taħt:				
Thiamine hydrochloride	750	10 000- darba		
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10 000- darba		
Biotine	7,5	10 000- darba		

It-taħlita tal-vitamini kkombinati tiġi maħżuna ffrizata f'alikwoti żgħar. Il-vitamini jiżdiedu mal-mezz fit qabel l-użu.

N.B: Biex tiġi evitata l-preċipitazzjoni ta' l-imluħ meta jiġu ppreparati il-mezzi kollha, žid l-*aliquots* tat-taħlitiet tat-tifqisiet sa madwar 500 – 800 ml ilma deonizzat u mbagħad imla sa litru.

N.B: L-ewwel pubblikazzjoni tal-mezz M4 tista' tinsab f'Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

▼ M6

C.3. ALGA TAL-ILMA HELU U ĊJANOBATTERJI, TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 201 tal-OECD (2006, anness korrett fl-2011). Għet identifikata l-htieġa li jiġi estiz il-metodu ta' ttestjar biex jinkludi speċijiet addizzjonali u jiġi agġornat biex jissodisfa r-rekwiżiti għal valutazzjoni tal-periklu u l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi. Din ir-reviżjoni tlestiet abbażi ta' esperjenza Prattika estensiva, progress xjentifiku fil-qasam tal-istudji tat-tossicità algali, u użu regolatorju estensiv, li sehh mill-adozzjoni oriġinali.

2. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Il-fini ta' dan it-test huwa li jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika fuq it-tkabbir tal-mikroalgi tal-ilma helu u/jew iċ-ċjanobatterji. Organizmi tal-ittest-jjar li qegħdin jikbru esponenzjalment huma esposti għas-sustanza kimika tat-test f'kulturi tal-lott fuq perjodu li normalment ikun ta' 72 siegħa. Minkejja d-durata relattivament qasira tat-test, l-effetti fuq diversi ġenerazzjonijiet jistgħu jiġu vvalutati.
4. Ir-rispons tas-sistema huwa t-tnaqqis fit-tkabbir f'serje ta' kulturi algali (unitajiet tal-ittestjar) esposti għal diversi konċentrazzjonijiet ta' sustanza kimika tat-test. Ir-rispons huwa evalwat bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni meta mqabbel mat-tkabbir medju tar-replikat, kulturi tal-kontroll mhux esposti. Għal espressjoni shiha tar-rispons tas-sistema għall-effetti tossiċi (sensittività ottimali), il-kulturi huma permessi tkabbir esponenzjali illimitat f'kundizzjonijiet ta' nutrijenti suffiċjenti u dawl kontinwu għal perjodu twil biżżejjed ta' żmien biex jitkejjel it-tnaqqis tar-rata ta' tkabbir speċifiku.
5. It-tkabbir u l-inibizzjoni tat-tkabbir huma kkwantifikati minn kejl tal-bijomassa algali bħala funzjoni taz-żmien. Il-bijomassa algali hija ddefinita bħala l-piż xott skont il-volum, eż. algi/litri mg ta' soluzzjoni tat-test. Madankollu, il-piż xott huwa diffiċli biex jitkejjel u għalhekk jintużaw parametri sostituti. Minn dawn is-surrogati, hafna drabi jintuża l-ghadd taċ-ċelloli. Parametri ta' surrogati oħra jinkludu l-volum taċ-ċelloli, il-fluwo-rexxenza, id-densità ottika, eċċ. Għandu jkun magħruf fattur ta' konverżjoni bejn il-parametru sostitut imkejjel u l-bijomassa.
6. Dan il-punt ta' tmiem l-ittestjar huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-zieda logaritmika fil-bijomassa (rata ta' tkabbir speċifika medja) matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rati medji ta' tkabbir speċifiku rreġistrati f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala $1-E_r C_x$ (eż. $E_r C_{50}$).
7. Rispons varjabbli addizzjonali użat f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-rendiment, li jista' jkun mehtieġ sabiex jiġu ssodisfati rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Huwa ddefinit bħala l-bijomassa f' tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni neqes il-bijomassa fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni. Mill-prodott rreġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġġib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' prodott (eż. 50 %) determinata u espressa bħala $1-E_y C_x$ (eż. $E_y C_{50}$).
8. Barra minn hekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

▼ **M6****INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST**

9. Informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test li jaf tkun siewja biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test inklużi l-formula strutturali, il-purità, l-istabbiltà fid-dawl, l-istabbiltà fil-kundizzjonijiet tat-test, il-proprietajiet ta' assorbiment tad-dawl, il- pK_a , u r-riżultati tal-istudji tat-trasformazzjoni li jinkludu l-bijodegradabilità fl-ilma.
10. Is-solubbiltà fl-ilma, il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (P_{ow}) u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun magħrufa u għandu jkun disponibbli metodu vvalidat għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fis-soluzzjonijiet tat-test b'effiċjenza tal-irkupru rapportata u limitu ta' detezzjoni.

VALIDITÀ TAT-TEST

11. Biex it-test ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin:

— Il-bijomassa fil-kulturi tal-kontroll għandhom ikunu żdiedu b'mod esponenzjali b'fattur ta' mill-anqas 16 fi żmien il-perjodu ta' ttestjar ta' 72 siegħa. Din tikkorrispondi għal rata ta' tkabbir speċifika ta' $0,92 \text{ gurnata}^{-1}$. Għall-ispeċijiet użati l-iktar frekwentement, ir-rata ta' tkabbir ġeneralment tkun sostanzjalment oghla (ara l-Appendiċi 2). Dan il-kriterju jaf ma jiġix sodisfatt meta jintużaw speċijiet li jikbru iktar bil-mod minn daww elenkati fl-Appendiċi 2. F'dan il-każ, il-perjodu tal-ittestjar għandu jiġi estiż biex jinkiseb tal-inqas tkabbir 16-il darba ikbar fil-kulturi tal-kontroll, filwaqt li t-tkabbir għandu jkun esponenzjali matul il-perjodu tal-ittestjar. Il-perjodu tal-ittestjar jista' jitqassar għal tal-inqas 48 siegħa biex jinżamm tkabbir illimitat u esponenzjali matul it-test sakemm jintlaħaq il-fattur ta' multiplikazzjoni minimu ta' 16.

— Il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni għal rati ta' tkabbir speċifiċi skont is-sezzjoni (jiem 0-1, 1-2 u 2-3, għal testijiet ta' 72 siegħa) fil-kulturi ta' kontroll (Ara l-Appendiċi 1 taht "koeffiċjent ta' varjazzjoni") ma għandux jaqbeż il-35 %. Ara l-paragrafu 49 għall-kalkolu tar-rata ta' tkabbir speċifika skont is-sezzjoni. Dan il-kriterju japplika għall-valur medju tal-koeffiċjenti ta' varjazzjoni kkalkolati għall-kulturi tal-kontroll irrepplikati.

— Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-rati ta' tkabbir speċifiċi medji matul il-perjodu tal-ittestjar kollu fil-kulturi ta' kontroll tar-repliki ma għandux jaqbeż 7 % fit-testijiet b'Pseudokirchneriella subcapitata u Desmodesmus subspicatus. Għal speċijiet oħrajn ittestjati inqas spiss, il-valur ma għandux jaqbeż 1-10 %.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

12. Is-sustanza (jew sustanzi) ta' referenza bħal 3,5-diklorofenol użata fir-ring-test internazzjonali (1), tista' tiġi ttestjata bħala mezz ta' vverifikar tal-proċedura tal-ittestjar. Id-dikromat tal-potassju jista' jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza għal alga ħadra wkoll. Idealment tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza mill-anqas darbtejn fis-sena.

APPLIKABILITÀ TAT-TEST

13. Dan il-metodu ta' ttestjar iktar faċli jiġi applikat għal sustanzi kimiċi li jinhallu fl-ilma li, fil-kundizzjonijiet tat-test, aktarx li jibqgħu fl-ilma. Għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi li huma volatili, adsorbenti ħafna, ikkulturi, b'solubbiltà baxxa fl-ilma jew sustanzi kimiċi li jistgħu jaffettwaw

▼ M6

id-disponibbiltà ta' nutrijenti jew minerali fil-midjum tat-test, jistgħu jkunu mehtieġa ċerti modifiki tal-proċedura deskritta (eż. sistema magħluqa, kundizzjonar tar-riċipjent tat-test). Hija pprovduta gwida dwar xi modifiki xierqa f'(2) (3) u (4).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR**Apparat**

14. Ir-riċipjenti tat-test u apparat iehor li se jrin jiġu f'kuntatt mas-soluzzjonijiet tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament inert iehor. L-oġġetti għandhom jinhaslu sew biex jiġi żgurat li ebda kontaminant organiku jew inorganiku ma jinterferixxi mat-tkabbir tal-alga jew il-kompożizzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test.
15. Ir-riċipjenti tat-test normalment ikunu fliexken tal-ħġieġ b'qisien li jippermettu volum suffiċjenti ta' kultura għall-kejl matul it-test u trasferiment suffiċjenti ta' massa ta' CO₂ mill-atmosfera (ara l-paragrafu 30). Ta' min jinnota li l-volum tal-likwidu għandu jkun biżżejjed għal determinazzjonijiet analitiċi (ara l-paragrafu 37).
16. Barra minn hekk, jaf ikun mehtieġ it-tagħmir li ġej jew kollu kemm hu:

— Apparat tal-kultura: huwa rakkomandat armadju jew kompartment, fejn tista' tinzamm it-temperatura ta' inkubazzjoni magħżula fi ± 2 °C.

— Strumenti ta' kejl ħfief: ta' min jgħid li l-metodu ta' kejl tal-intensità tad-dawl, u b'mod partikolari t-tip ta' riċettur (kollettur), jista' jaffettwa l-valur imkejjel. Idealment, il-kejl għandhom isiru permezz ta' riċettur (4 π) sferiku (li jirrispondi għal dawl dirett u rifless mill-angoli kollha 'l fuq u taht il-pjan tal-kejl), jew riċettur $\pi/2$ (li jirrispondi għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan tal-kejl).

— Apparat biex tiġi ddeterminata l-bijomassa algali. L-ghadd taċ-ċelloli, li huwa l-iktar parametru sostitut użat spiss għall-bijomassa algali, jista' jsir permezz ta' kontantur elettroniku tal-partiċelli, mikroskopju b'kompartment tal-ghadd, jew ċitometru tal-fluss. Surrogati tal-bijomassa oħrajn jistgħu jitkejlu permezz ta' ċitometru tal-fluss, fluworimetru, spettrofotometru jew kulurimetru. Fattur ta' konverżjoni li jirrelata l-ghadd ta' ċelloli mal-piż xott huwa siewi għall-kalkolu. Sabiex jiġu pprovduti miżuri siewja f'konċentrazzjonijiet baxxi tal-bijomassa meta jintuża spettrofotometru, jaf ikun mehtieġ li jintużaw kuvetti b'passaġġ tad-dawl ta' mill-anqas 4 cm.

Organizmi tat-test

17. Jistgħu jintużaw diversi speċijiet ta' mikroalgi li ma jaggregawx u ċjanobatterji. Intwera li r-razez elenkati fl-Appendiċi 2 huma xierqa bil-proċedura tal-ittestjar speċifikata f'dan il-metodu ta' ttestjar.
18. Jekk jintużaw speċijiet oħrajn, għandha tiġi rrapportata r-razza u/jew l-orijini. Ikkonferma li t-tkabbir esponenzjali tal-alga tat-test magħżula tista' tinzamm matul il-perjodu ta' ttestjar fil-kundizzjonijiet eżistenti.

Midjum ta' tkabbir

19. Huma rakkomandati żewġ midjums ta' tkabbir alternattivi, il-midjum tal-AAP u l-OECD u. Il-kompożizzjonijiet ta' dawn il-midjums huma indikati fl-Appendiċi 3. Kun af li l-valur tal-pH inizjali u l-kapaċità ta' bbaferjar (li tirregola ż-żieda fil-pH) taż-żewġ midjums huma differenti. Għalhekk, ir-riżultati tat-testijiet jaf ikunu differenti skont il-midjum użat, b'mod partikolari meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi jonizzanti.

▼ M6

20. Jaf tkun meħtieġa modifika tal-midjums ta' tkabbir għal ċerti finijiet, eż. meta jiġu ttestjati metalli u aġenti kelanti jew meta jsir ittestjar f'valuri tal-pH differenti. L-użu ta' midjum immodifikat għandu jiġi deskritt fid-dettall u ġġustifikat (3) (4).

Konċentrazzjoni tal-bijomassa inizjali

21. Il-bijomassa inizjali fil-kulturi tat-test għandha tkun l-istess fil-kulturi tat-test kollha u baxxa biżżejjed biex tippermetti tkabbir esponenzjali matul il-perjodu ta' inkubazzjoni kollu mingħajr ir-riskju ta' tnaqqis fin-nutrijenti. Il-bijomassa inizjali ma għandhiex taqbeż iż-0,5 mg/l bħala piż xott. Huma rakkomandati l-konċentrazzjonijiet ta' ċelloli inizjali li ġejjin:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \times 10^3 - 10^4$ ċelloli/ml
Desmodesmus subspicatus	$2-5 \times 10^3$ ċelloli/ml
Navicula pelliculosa	10^4 ċelloli/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 ċelloli/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 - 10^5$ ċelloli/ml

Konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test

22. Il-medda tal-konċentrazzjoni li fiha l-effetti x'aktarx li jseħhu hija determinata fuq il-bażi tar-riżultati mit-testijiet tas-sejbien tal-medda. Għat-test finali definitiv, għandhom jintgħazlu tal-inqas hames konċentrazzjonijiet, irrangati f'serje ġeometrika b'fattur li ma jaqbixx it-3.2. Għal sustanzi kimiċi tat-test li juru kurva konċentrazzjoni rispons stabbli, jista' jkun iġġustifikat fattur oghla. Idealment, is-serje ta' konċentrazzjoni għandha tkopri l-medda li tikkawża inibizzjoni ta' 5-75 % tar-rata ta' tkabbir tal-alga.

Repliki u kontrolli

23. Id-disinn tat-test għandu jinkludi tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test. Jekk ma jkunx meħtieġ li tiġi ddeterminata l-NOEC, id-disinn tat-test jista' jinbidel biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. In-numru ta' repliki tal-kontroll għandu jkun tal-inqas tlieta, u idealment għandu jkun id-doppju tan-numru ta' repliki użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.
24. Jista' jithejja sett separat ta' soluzzjonijiet tat-test għal determinazzjonijiet analitiċi tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafi 36 u 38).
25. Meta jintuża solvent biex tinhall is-sustanza kimika tat-test, kontrolli addizzjonali li fihom is-solvent fl-istess konċentrazzjoni kif użat fil-kulturi tat-test għandhom jiġu inkluzi fid-disinn tat-test.

Thejjiġa tal-kultura tal-inokulu

26. Sabiex l-alga tal-ittestjar tiġi adattata għall-kundizzjonijiet tat-test u jiġi żgurat li l-algi huma f'fażi ta' tkabbir esponenzjali meta jintużaw biex jinkulaw is-soluzzjonijiet tat-test, tithejja kultura tal-inokulu fil-midjum tat-test bejn jumejn u 4 ijiem qabel jibda t-test. Il-bijomassa algali għandha tiġi aġġustata sabiex tippermetti li jkun hemm tkabbir esponenzjali fil-kultura tal-inokulu sakemm jibda t-test. Inkuba l-kultura tal-inokulu fl-istess kundizzjonijiet bħall-kulturi tat-test. Kejjel iż-żieda fil-bijomassa fil-kultura

▼ M6

tal-inokulu biex tiżgura li t-tkabbir huwa fi hdan il-medda normali għar-razza tal-ittestjar f'kundizzjonijiet ta' kulturi. Eżempju tal-proċedura għall-kulturi algali huwa deskritt fl-Appendiċi 4. Biex jiġu evitati diviżjonijiet ta' ċelloli sinkroniċi matul it-test jaf ikun mehtieg pass ieħor ta' propagazzjoni tal-kultura tal-inokulu.

Thejjija tas-soluzzjonijiet tat-test

27. Is-soluzzjonijiet tat-test kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjonijiet tal-midjum ta' tkabbir u l-bijomassa inizjali tal-alga tat-test. Is-soltu, is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin jithejjew billi tithallat soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test b'midjum ta' tkabbir u kultura tal-inokulu. Is-soluzzjonijiet ewlenin normalment jithejjew billi s-sustanza kimika tithalla tinhall fil-midjum tat-test.
28. Jistgħu jintużaw solventi, bħal aċeton, alkohol t-butyl u dimetil formamid bħala portaturi sabiex jiżdiedu sustanzi kimiċi b'solubbiltà baxxa mal-midjum tat-test (2)(3). Il-konċentrazzjoni ta' solvent ma għandhiex taqbeż il-100 µl/l, u l-istess konċentrazzjoni ta' solvent għandha tiżdied mal-kulturi kollha (inkluż il-kontrolli) fis-serje tat-test.

Inkubazzjoni

29. Aġhti r-reċipjenti tat-test b'tappijiet li tgħaddi l-arja minnhom. Ir-reċipjenti jitheżżu u jitqiegħdu fl-apparat tal-kulturi. Matul it-test huwa mehtieg li l-algi jinżammu f'sospensjoni u sabiex tiffaċilita trasferiment ta' CO₂. Għal dan il-ghan, għandek theżżeż jew thawwad b'mod konsistenti. Il-kulturi għandhom jinżammu f'temperatura fil-medda ta' 21 sa 24 °C, ikkontrollati f'± 2 °C. Għal speċijiet għajr dawk elenkati fl-Appendiċi 2, eż. speċijiet tropikali, jaf ikunu xierqa temperaturi oghla, sakemm jistgħu jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità. Huwa rakkomandat li l-flasks jitqiegħdu b'mod każwali u li jerġgħu jiġu pozzizzjonati mill-ġdid kuljum fl-inkubatur.
30. Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1,5 unitajiet matul it-test. Għal metalli u sustanzi kimiċi li parzjalment jonizzaw b'pH madwar il-pH tat-test, jista' jkun mehtieg li jiġi limitat it-tifrix tal-pH biex jinkisbu riżultati riproduttivi u ddefiniti sew. Differenza ta' < 0,5 pH unità hija teknikament fattibbli u tista' tiġi miksuba billi tiġi żgurata rata ta' trasferiment ta' massa ta' CO₂ adegwata mill-arja tal-madwar tas-soluzzjoni tat-test, eż. billi tiżdied ir-rata taċ-ċaqlieq. Possibilità oħra hija li titnaqqas id-domanda għal CO₂ billi titnaqqas il-bijomassa tal-bidu jew it-tul tat-test.
31. Il-wieċ fejn il-kulturi huma inkubati għandu jingħata illuminazzjoni fluwo-rexenti, uniformi, kontinwa, eż. tat-tip “cool-white” jew “daylight”. Razez ta' algi u ċjanobatterji jvarjaw fir-rekwiżti tad-dawl tagħhom. L-intensità tad-dawl għandha tintgħażel biex taddatta għall-organizmu tat-test użat. Għal speċijiet rakkomandati ta' algi hodor, aghżel l-intensità tad-dawl fil-livell tas-soluzzjonijiet tat-test mill-medda ta' 60-120 µE · m⁻² · s⁻¹ meta titkejjel fil-medda ta' tul ta' mewġa fotosintetikament effikaċi ta' 400 – 700 nm permezz ta' riċettur xieraq. Xi speċijiet, b'mod partikolari *Anabaena flos-aquae*, jikbru sew f'intensitajiet tad-dawl iktar baxxi u jaf issirillhom hsara f'intensitajiet għolja. Għal dawn l-ispeċi għandha tintgħażel intensità ta' dawl medja fl-isfera ta' 40-60 µE · m⁻² · s⁻¹. (Għal strumenti ta' kejl tad-dawl ikkalibrati fil-lux, medda ekwivalenti ta' 4 440 – 8 880 lux għal dawl cool white tikkorrispondi bejn wieħed u ieħor għall-intensità tad-dawl rakkomandata 60-120 µE · m⁻² · s⁻¹). Zomm l-intensità tad-dawl fi hdan ± 15 % mill-intensità tad-dawl medja fuq iż-zona tal-inkubazzjoni.

▼ **M6****Durata tat-test**

32. Normalment it-test jiehu 72 siegħa. Madankollu, jistgħu jintużaw durati tat-test iqsar jew itwal diment li jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità kollha fil-paragrafu 11.

Kejl u determinazzjonijiet analitiċi

33. Il-bijomassa algali f'kull flask hija ddeterminata tal-inqas kuljum matul il-perjodu tal-ittestjar. Jekk isiru miżuri fuq volumi żgħar imnehhija mis-soluzzjoni tat-test bil-pipetta, dawn ma għandhomx jiġu ssostitwiti.
34. Il-kejl tal-bijomassa jsir bl-ghadd manwali taċ-ċelloli minn mikroskopju jew apparat elettroniku li jghodd il-partiċelli (minn ghadd taċ-ċelloli/jew bijo-volum). Jistgħu jintużaw tekniki alternattivi, eż. ċitometrija tal-fluss, fluwo-rexxenza klorofilljana *in vitro* jew *in vivo* (5) (6), jew densità ottika jekk tista' tintwera korrelazzjoni sodisfaċenti tul il-medda ta' bijomassa li ssehh fit-test.
35. Kejjel il-pH tas-soluzzjonijiet fil-bidu u fl-ahħar tat-test.
36. Sakemm tkun disponibbli proċedura analitika għad-determinazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-medda tal-konċentrazzjoni użata, is-soluzzjonijiet tat-test għandhom jiġu analizzati biex jiġu vverifikati l-konċentrazzjonijiet u ż-żamma inizjali tal-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni matul it-test.
37. Analizi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fl-ahħar tat-test tat-test ta' konċentrazzjoni għolja u baxxa, u konċentrazzjoni madwar il-mistennija EC₅₀ tista' tkun suffiċjenti fejn x'aktarx il-konċentrazzjonijiet esposti jvarjaw inqas minn 20 % mill-valuri nominali matul it-test. Hija rakkomandata analiżi tal-konċentrazzjonijiet tat-test kollha fil-bidu u fi tmiem tat-test, meta ma jkunx probabbli li l-konċentrazzjonijiet jibqgħu fi hdan it-80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali. Għal sustanzi kimiċi tat-test volatili, mhux stabbli, adsorbenti hafna huma rakkomandati kampjuni addizzjonali għall-analiżi f'intervalli ta' 24 siegħa matul il-perjodu ta' espożizzjoni sabiex jiġi ddefinit ahjar it-telf tas-sustanza kimika tat-test. Għal dawn is-sustanzi kimiċi, jaf ikunu mehtieġa repliki żejda. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test tista' titwettag biss fuq reċipjent tar-repliki wiehed f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-reċipjenti migbura mir-replikat).
38. Il-midjums tal-ittestjar imhejjija speċifikament għall-analiżi tal-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni matul it-test għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod bhal dawk użati għall-ittestjar, jiġifieri għandhom jiġu inokulati b'algi u inkubatur fl-istess kundizzjonijiet. Jekk tkun mehtieġa analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mahlula, jaf tkun mehtieġa separazzjoni tal-alga mill-midjum. Idealment, is-seperazzjoni għandha issir b'ċentrifugazzjoni b'forza-g baxxa, suffiċjenti biex tissettja l-alga.
39. Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata nżammet b'mod sodisfaċenti fi hdan 20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla ma tkunx fi hdan il-medda ta' ± 20 %, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika matul l-espożizzjoni jew fuq il-mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (3) (7).

▼ M6

40. It-test ta' inibizzjoni tat-tkabbir tal-alga huwa sistema ta' ttestjar iktar dinamiku mill-biċċa l-kbira tat-testijiet tat-tossiċità akkwatika għal terminu qasir l-oħrajn. Bħala konsegwenza, jaf ikun diffiċli tiddefinixxi l-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni attwali, speċjalment għall-adsorbiment ta' sustanzi kimiċi ttestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. F'tali każijiet, l-ghajbien tas-sustanza kimika tat-test mis-soluzzjoni b'adsorbiment mal-bijomassa algali li dejjem tizdied ma jfissirx li din tintilef mis-sistema tat-test. Meta jiġi analizzat ir-risultat tat-test, għandu jiġi ċċekkjat jekk tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test matul it-test huwiex akkumpanjat minn tnaqqis fl-inibizzjoni tat-tkabbir. Jekk dan ikun il-każ, tista' tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' mudell xieraq li jiddeskrivi t-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (7). Jekk le, jaf ikun xieraq li tibbaża l-analiżi tar-risultati fuq il-konċentrazzjonijiet (nominali jew imkejla) inizjali.

Osservazzjonijiet oħra

41. Għandha titwettaq osservazzjoni mikroskopika biex tiġi vverifikata dehra normali u sana ta' kultura tal-inokulu u biex tiġi osservata kwalunkwe dehra anormali tal-alga (peress li jaf tkun ikkawżata mill-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test) fi tmiem it-test.

Test tal-limitu

42. F'ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-midjum tat-test (irrispettivament minn liema huwa l-inqas), jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi tqabbil tar-risponsi fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament partikolari (100 mg/l jew konċentrazzjoni daqs il-limitu ta' solubbiltà). Huwa rakkomandat hafna li dan jiġi appoġġjat minn analiżi tal-konċentrazzjoni tal-espożizzjoni. Japplikaw kull kundizzjoni tat-test u kriterju ta' validità deskritti preċedement għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandhom ikunu tal-inqas sitta. Il-varjabbli tar-rispons fil-grupp ta' kontroll u trattament jistgħu jiġu analizzati permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-medji, eż. Test-t ta' Student. Jekk il-varjanzi taż-żewġ gruppi ma jkunux l-istess, għandu jsir test-t aġġustat għal varjanzi mhux indaqs.

DEJTA U RAPPORTAR**Ipplottjar tal-kurvi tat-tkabbir**

43. Il-bijomassa fir-reċipjenti tat-test, tista' tiġi espressa f'unitajiet tal-parametru sostitut użat għall-kejl (eż. in-numru ta' ċelloli, fluworexxenza).
44. Indika l-konċentrazzjoni ta' bijomassa stmata fil-kulturi tat-test u l-kontrolli flimkien mal-konċentrazzjonijiet tal-materjal tat-test u l-hinijiet tal-kejl, irreġistrata b'rizoluzzjoni ta' mill-anqas sığhat shah, biex jiġu prodotti plottijiet ta' kurvi ta' tkabbir. Kemm l-iskali logaritmiċi kif ukoll l-iskali lineari jistgħu jkunu utli f'dan l-istadju, iżda l-iskali logaritmiċi huma obbligatorji u ġeneralment jagħtu preżentazzjoni aħjar tal-varjazzjonijiet fil-mudell ta' tkabbir matul il-perjodu tal-ittestjar. Ta' min jinnota li tkabbir esponenzjali jipproduċi linja dritta meta jiġi pplottat fuq skala logaritmika, u inklinazzjoni tal-linja (gradient) tindika r-rata ta' tkabbir speċifika.
45. Permezz tal-plottijiet, eżamina jekk il-kulturi ta' kontroll jikbrux b'mod esponenzjali bir-rata mistennija matul it-test kollu. Eżamina l-punti ta' dejta kollha u d-dehra tal-graffs b'mod kritiku u ċċekkja d-dejta mhux ipproċessata u l-proċeduri għall-iżbalji possibbli. Iċċekkja b'mod partikolari kwalunkwe punt ta' dejta li jidher li jiddevja bi żball sistematiku. Jekk ikun ovvju li l-iżbalji proċedurali jistgħu jiġu identifikati u/jew jitqiesu probabbli hafna, il-punt ta' dejta speċifiku huwa mmarkat minn outlier u mhuwiex inkluz f'analizi statistika sussegwenti. (Konċentrazzjoni algali zero

▼ M6

f'wiehed miż-żewġ jew tliet reċipjenti tar-repliki tista' tindika li r-reċipjent ma kienx inokulat b'mod korrett, jew tnaddaf b'mod mhux xieraq). Iddikjara r-raġunijiet għar-rifjut ta' punt ta' deġa bħala outlier fir-rapport tat-test. Ir-raġunijiet aċċettati huma biss żbalji proċedurali (rari) u mhux sempliċi preċiżjoni hażina. Il-proċeduri tal-istatistika għall-identifikazzjoni tal-outlier huma ta' użu limitat għal din it-tip ta' problema u ma jistgħux jiehdu post il-gudizzju tal-esperti. Idealment l-outliers (immarkati bħala tali) għandhom jinżammu fost il-punti ta' deġa murija fi kwalunkwe preżentazzjoni ta' deġa grafika jew tabulari sussegwenti.

Varjabbli ta' rispons

46. L-iskop tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir tal-alga. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli ta' rispons, peress li ġurisidizzjonijiet differenti għandhom preferenzi u htigijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli fil-ġurisidizzjonijiet kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati permezz taż-żewġ varjabbli tar-rispons (a) u (b) deskritti hawn taħt.

- (a) **Rata ta' tkabbir speċifika medja**: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat abbażi taż-żieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu tal-ittestjar, espressa għal kull jum

- (b) **Rendiment**: dan il-varjabbli tar-rispons huwa l-bijomassa fi tmiem it-test li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu.

47. Ta' min jinnota li l-valuri tat-tossiċità kkalkolati permezz ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jitqabblu u din id-differenza għandha tiġi rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) ikunu ġeneralment oghla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu ta' ttestjar jiġu rrispettati, minhabba l-bażi matematika tal-approċċi rrispettivi. Dan ma għandux jiġi interpretat bħala d-differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, iżda semplicement li li l-valuri huma matematikament differenti. Il-kuncett ta' rata ta' tkabbir speċifika medja huwa bbażat fuq il-mudell ta' tkabbir esponenzjali tal-alga f'kulturi mhux limitati, fejn it-tossiċità hija stmata abbażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir, mingħajr ma tiddependi fuq il-livell assolut tar-rata ta' tkabbir speċifika tal-kontroll, il-gradjent tal-kurva konċentrazzjoni rispons jew fuq id-durata tat-test. B'kuntrast, ir-riżultati bbażati fuq il-varjabbli tar-rispons tar-rendiment-jiddependu fuq dawn il-varjabbli l-oħra kollha. E_yC_x huwa dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċi ta' alga użata fit-test u fuq ir-rata massima ta' tkabbir speċifiku li tista' tvarja bejn speċijiet u kif ukoll bejn razzi differenti ta' alga. Dan ir-rispons varjabblima għandux jintuża għat-tqabbil tas-sensittività għat-tossikanti fost l-ispeċijiet ta' algi jew anki razzi differenti. Filwaqt li l-użu tar-rata ta' tkabbir speċifika medja għall-istima tat-tossiċità huwa ppreferut xjentifikament, l-istimi tat-tossiċità ibbażati fuq ir-rendiment huma inkluzi wkoll f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti regolatorji attwali f'xi pajjiżi.

Rata ta' tkabbir medja

48. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għal perjodu speċifiku hija kkalkolata bħala ż-żieda logaritmika fil-bijomassa mill-ekwazzjoni għal kull reċipjenti uniku tal-kontrolli u t-trattamenti [1]:

▼ **M6**

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{jum}^{-1}) \quad [1],$$

fejn:

μ_{i-j} hija r-rata medja speċifika ta' tkabbir minn i sa j ;

X_i hija l-bijomassa fil- i ;

X_j hija l-bijomassa fil- j ;

Għal kull grupp ta' trattament u kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

49. Ikkalkola r-rata ta' tkabbir speċifika medja matul id-durata kollha tat-test (normalment 0-3 ijiem), permezz tal-bijomassa inokulata nominalment bħala l-valur tal-bidu iktar minn valur tal-bidu mkejje, peress li b'dan il-mod, normalment tinkiseb iktar preċiżjoni. Jekk it-tagħmir użat għall-kejl tal-bijomassa jippermetti determinazzjoni preċiża biżżejjed tal-bijomassa tal-inokulu (eż. citometru tal-fluss) allura tista' tintuża l-konċentrazzjoni tal-bijomassa inizjali mkejja. Ivvaluta wkoll ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni, ikkalkolata bħala r-rati ta' tkabbir speċifiċi għal kull jum matul il-kors tat-test (0-1, 1-2 u 2-3 jiem) u eżamina jekk ir-rata ta' tkabbir tal-kontroll tibqax kostanti (ara l-kriterji tal-validità, paragrafu 11). Rata ta' tkabbir speċifika sinifikament inqas fl-ewwel jum mir-rata ta' tkabbir speċifika medja totali tista' tindika fażi latenti. Filwaqt li fażi latenti tista' titnaqqas u prattikament tiġi eliminata f'kulturi tal-kontroll bi propagazzjoni xierqa tal-prekultura, fażi latenti f'kulturi esposti tista' tindika rkupru wara stress tossiku inizjali jew tnaqqis fl-espożizzjoni minhabba telf ta' sustanza kimika tat-test (inkluz sorbiment fil-bijomassa algali) wara l-espożizzjoni inizjali. Għalhekk ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni tista' tiġi vvalutata sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jseħħu fil-perjodu ta' espożizzjoni. Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni u r-rata ta' tkabbir medja jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li hija ggarantita eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir.

50. Ikkalkola l-inibizzjoni perċentwali tar-rata ta' tkabbir għal kull replikat ta' trattament mill-ekwazzjoni [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_r}{\mu_c} \times 100 \quad [2],$$

fejn:

$\%I_r$ = inibizzjoni perċentwali fir-rata ta' tkabbir speċifika medja;

μ_c = valur medju għal rata medja ta' tkabbir speċifiku (μ) fil-grupp ta' kontroll;

μ_r = rata medja ta' tkabbir speċifiku għar-replika ta' trattament;

51. Meta biex jiġi testat is-soluzzjonijiet tat-test jintużaw solventi, għandhom jintużaw il-kontrolli bis-solventi u mhux ili l-kontrolli bla solventi fil-kalkolu ta' inibizzjoni perċentwali.

Rendimento

52. Ir-rendiment huwa kkalkolat bħala l-bijomassa fi tmiem it-test li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għal kull reċipjent uniku ta' kontrolli u trattamenti. Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. Il-persentaġġ ta' inibizzjoni fil-prodott ($\%I_y$) jista' jiġi kkalkulat għal kull replika ta' trattament kif ġej:

▼ M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

fejn:

$\% I_y$ = inibizzjoni perċentwali tar-rendiment;

Y_C = valur medju għall-prodott fil-grupp ta' kontroll;

Y_T = valur għall-prodott għar-replika ta' trattament.

Ipplottjar tal-kurva konċentrazzjoni rispons

53. Ipplottja l-perċentwali tal-inibizzjoni mal-logaritma tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u eżamina l-plott bir-reqqa, filwaqt li tinjora kwalunkwe tali punt ta' dejta li gie individwat bħala outlier fl-ewwel fażi. Għaddi linja ċara mill-punti ta' dejta b'għajnejk jew b'interpolazzjoni bil-kompjuter biex tiegħu idea tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons, u mbagħad kompli b'metodu iktar iddettaljat, idealment metodu statistiku kompjuterizzat. Skont l-użu intiz tad-dejta, il-kwalità (preċiżjoni) u l-ammont ta' dejta, kif ukoll id-disponibbiltà ta' għodda ta' analiżi tad-dejta, jista' jiġi deċiż (u xi drabi għustifikat sew) li titwaqqaf l-analiżi tad-dejta f'dan l-istadju u sempliċement jinqraw il-figuri prinċipali EC_{50} u EC_{10} (u/jew EC_{20}) mill-kurva mdahhla fuq l-għajn (ara wkoll it-taqsimu ta' hawn taht fuq effetti stimulatorji). Raġunijiet validi biex ma jintużax metodu statistiku jistgħu jinkludu:

- Id-dejta mhijiex xierqa għal metodi kompjuterizzati biex jipproduċu xi riżultat affidabbli iehor apparti dawk li jistgħu jinkisbu b'gudizzju espert
- Ftali sitwazzjonijiet xi programmi tal-kompjuter jistgħu anki jonqsu milli jipproduċu soluzzjoni affidabbli (ir-rikorrenzi jaf ma jaqblux, eċċ.)
- Ir-risponsi għal tkabbir stimulatorju ma jistgħux jiġu indirizzati b'mod adegwat permezz tal-programmi tal-kompjuter disponibbli (ara hawn taht).

Proċeduri statistiċi

54. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analizi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ppezata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta dwar ir-rispons — pereżempju f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (8), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmanigġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli ta' dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet bla intoppi. Meta jkun viċin inibizzjoni żero jew totali, tali irregolaritajiet jistgħu jtkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analiżi (8). Ta' min jinnotta li metodi standard ta' analiżi bl-użu ta' trasformati ta' probit, logit jew Weibull huma mahsuba għall-użu f'dejta kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u jridu jiġu mmodifikati biex jakkomodaw id-dejta dwar it-tkabbir jew il-bijomassa. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinstabu f(9), (10), u (11). L-użu ta' analiżi tar-rigressjoni mhux lineari huwa ddettaljat iktar fl-Appendiċi 5.
55. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x . Fejn ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. Kemm toqghod tajjeb id-dejta dwar ir-rispons għall-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament. Jekk, madankollu, ma jkunx faċli li tintuża

▼ **M6**

kurva mhux lineari huwa diffiċli jew ma jirnexxiex minhabba dispersjoni kbira wisq fid-dejta, il-problema tista' tiġi evitata billi ssir ir-rigressjoni fuq il-medji tal-grupp bħala mod Prattiku ta' tnaqqis fl-influwenza ta' outliers suspettati. L-użu ta' din l-għażla għandu jiġi identifikat fir-rapport tat-test bħala devjazzjoni mill-proċedura normali peress li l-interpolazzjoni ta' kurva b'repliki individwali ma pproduċietx riżultat tajjeb.

56. Stimuli EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (13), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibbli m'humiex xierqa għad-data.
57. Għal stima tal-LOEC u, għalhekk, l-NOEC, għal effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-rata ta' tkabbir, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji tat-trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Imbagħad il-medja għal kull konċentrazzjoni għandha titqabbel mal-medja tal-kontroll permezz ta' tqabbil multiplu xieraq jew test tat-tendenza. It-test ta' Dunnett jew Williams jista' jkun siewi (12)(14)(15)(16)(17). Huwa meħtieġ li jiġi vvalutat jekk treggix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta' varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettagh grafikament jew b'test formali (17). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omoġeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tiġi kkunsidrata analiżi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. Fi (11) tista' tinstab gwida addizzjonali dwar id-determinazzjoni tal-NOEC.
58. Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimuli EC_x ta' punti bbażati fuq regressjoni. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan it-test algali. Sfera ta' 10 sa 20 % tidher li hija xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment kemm $l-EC_{10}$ u EC_{20} għandhom jiġu rrapportati.

Stimulazzjoni tat-tkabbir

59. Xi drabi hija osservata stimulazzjoni tat-tkabbir (inibizzjoni negattiva) f'konċentrazzjonijiet baxxi. Dan jista' jirriżulta minn ormeżi ("stimulazzjoni tossika") jew miż-zieda ta' fatturi ta' tkabbir ta' stimulazzjoni bil-materjal tat-test sal-midjum minimu użat. Ta' min jinnota li ż-żieda ta' nutrijenti inorganici ma għandu jkollha ebda effett dirett peress li l-midjum tat-test għandu jzomm eċċess ta' nutrijenti matul it-test. Stimulazzjoni f'doża baxxa tista' ġeneralment tiġi injorata f'kalkulazzjonijiet EC_{50} sakemm ma tkunx estrema. Madankollu, jekk hija estrema, jew valur EC_x għal x baxxa għandu jiġi kkalkulat, proċeduri speċjali jistgħu ikunu meħtieġa. Jekk ikun possibbli għandu jiġi evitat thassir ta' risponsi stimulatorji mill-analiżi tad-dejta, u jekk is-software li jadatta l-kurva ma jistax jaċċetta stimulazzjoni minuri, tista' tintuża interpolazzjoni lineari b'bootstrapping. Jekk l-istimulazzjoni tkun estrema, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tal-mudell tal-ormesi (18).

Inibizzjoni tat-tkabbir mhux tossiku

60. Materjali tal-ittestjar li jassorbu d-dawl jistgħu jagħtu lok għal tnaqqis fir-rata ta' tkabbir peress li d-dellijiet inaqqsu l-ammont ta' dawl disponibbli. Tali tipi fiżiċi ta' effetti għandhom jiġu sseparati minn effetti tossiċi billi jiġu mmodifikati l-kundizzjonijiet tat-test u dawn tal-aħħar għandhom jiġu rrapportati b'mod separat. Fi (2) u (3) tista' tinstab gwida.

RAPPORT TAL-ITTESTJAR

61. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

▼ M6*Sustanza kimika tat-test:*

- natura fizika u proprjetajiet fiżiċi u kimiċi rilevanti, inkluż il-limitu tas-solubbiltà fl-ilma;
- dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (eż. Numru CAS), inkluża l-purità (impuritajiet).

Speċijiet tat-test:

- ir-razza, il-fornitur jew is-sors u l-kundizzjonijiet tal-kulturi użati.

Kundizzjonijiet tat-test:

- id-data tal-bidu tal-ittestjar u d-durata tiegħu;
- deskrizzjoni tad-disinn tal-ittestjar, reċipjenti tat-test, volumi tal-kultura, densità tal-bijomassa fil-bidu tat-test;
- il-komposizzjoni tal-midjum;
- il-konċentrazzjoni tat-test u r-repliki (eż. numru ta' repliki, numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test u l-progress ġeometriku użat);
- deskrizzjoni tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test, inkluż l-użu ta' solventi eċċ.
- apparat tal-kulturi;
- l-intensità u l-kwalità tad-dawl (sors, omoġenità);
- it-temperatura;
- konċentrazzjonijiet ittestjati: il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u kwalunkwe riżultat tal-analizijiet biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Għandha tiġi rrapportata l-effiċjenza fl-irkupru tal-metodu u l-limitu tal-kwantifikazzjoni fil-matriċi tal-ittestjar;
- id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-metodu ta' ttestjar;
- il-metodu għad-determinazzjoni tal-bijomassa u l-evidenza tal-korrelazzjoni bejn il-parametru mkejjeż u l-piż xott;

Riżultati:

- valuri tal-pH fil-bidu u fi tmiem it-test fit-trattamenti kollha;
- il-bijomassa għal kull flask f'kull punt ta' kejl u l-metodu għall-kejl tal-bijomassa;
- kurvi ta' tkabbir (plott tal-bijomassa mal-ħin);
- il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;
- preżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett;

▼ **M6**

- stimi ta' tossiċità varjabbli ta' rispons eż. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀ u intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikkalkolati, LOEC u NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;
- jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti);
- kwalunkwe stimolazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament;
- kwalunkwe effett iehor osservat, eż. bidliet morfologiċi tal-alga;
- diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

- (1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.
- (2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.
- (5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
- (6) Slovence, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
- (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
- (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
- (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
- (10) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
- (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼ M6

- (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Id-definizzjonijiet u l-abbrevjazzjonijiet li ġejjin jintużaw għall-finijiet ta' dan il-metodu ta' ttestjar:

Il-bijomassa hija l-piż xott tal-materja ħajja preżenti f'popolazzjoni espressa f'termini ta' volum partikolari; eż. mg soluzzjoni ta' algi/litri. Generalment il-“bijomassa” hija ddefinita bħala l-massa, iżda f'dan it-test, din il-kelma tintuża biex tirreferi għall-massa skont il-volum. Barra minn hekk f'dan it-test, is-surrogati għall-bijomassa, bħall-ghadd taċ-ċelloli, il-fluworexxenza, eċċ. generalment jitkejlu u l-użu tat-terminu “bijomassa” għalhekk jirreferi wkoll għal dawn il-miżuri surrogati.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita

Koeffiċjent ta' varjazzjoni hija miżura mingħajr dimensjoni tal-varjabbiltà ta' parametru, iddefinit bħala l-proporzjon tad-devjazzjoni standard mill-medja. Dan jiġi jigi wkoll espress bħala valur perċentwali. Il-koeffiċjent medju ta' varjazzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika medja fil-kulturi ta' kontroll tar-replikat għandu jigi kkontrollat kif ġej:

1. Ikkalkola % CV tar-rata ta' tkabbir speċifika medja mir-rati ta' tkabbir kuljum/skont is-sezzjoni għar-replikat rispettiv;
2. Ikkalkola l-valur medju mill-valuri kollha kkalkolati skont il-punt 1 biex tikseb il-koeffiċjenti medju tal-varjazzjoni tar-rata tkabbir ta' kuljum/skont is-sezzjoni fil-kulturi ta' kontroll tar-repliki.

EC_x hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mahlula fil-midjum tat-test li tirriżulta fi tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir tal-organizmu tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat (li għandu jissewma b'mod espliċitu jekk ikun hemm devjazzjoni mid-durata tat-test kollu jew normali). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew prodott, is-simbolu “E_xC” huwa użat għar-rata ta' tkabbir u “E_yC” huwa użat għall-prodott.

Midjum ta' tkabbir huwa l-midjum tal-kultura sintetiku komplut li fih tikber l-alga tat-test meta tiġi esposta għas-sustanza kimika tat-test. Normalment is-sustanza kimika tat-test tinhall fil-midjum tat-test.

Rata ta' tkabbir (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija ż-zieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu ta' espożizzjoni.

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir ($b'p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'hin ta' espożizzjoni partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha oghla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż ugwali jew ikbar minn daww osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistghu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni shiha dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżatt taħt l-LOEC.

Il-varjabbli ta' rispons huwa varjabbli għall-istima tat-tossicità derivata minn parametri mkejla li jiddeskrivu l-bijomassa minn metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-metodu ta' ttestjar, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati mill-bijomassa ta' kejl direttament jew kwalunkwe wieħed mis-surrogati msemmija.

▼M6

Rata ta' tkabbir speċifika hija varjabbli ta' rispons iddefinit bħala l-kwozzjent tad-differenza tal-logaritmi naturali ta' parametru ta' osservazzjoni (f'dan il-metodu ta' ttestjar, il-bijomassa) u l-perjodu ta' żmien rispettiv.

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

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli tal-kejl fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni neqes il-valur tal-varjabbli tal-kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni biex tiġi espressa ż-żieda fil-bijomassa matul it-test.

▼ **M6***Appendiċi 2***Razez murija li huma xierqa għat-test*****Alga ħadra***

Pseudokirchneriella subcapitata (li qabel kienet magħrufa bħala *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (li qabel kienet magħrufa bħala *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Dijatomi

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Ċjanobatterji

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sorsi ta' Razez

Ir-razez rakkomandati huma disponibbli f'kulturi unjalgali mill-kollezzjonijiet li ġejjin (f'ordni alfabetiku):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Ambleside
Cumbria LA22 0LP
UK

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nickolausberger Weg 18
37073 Göttingen
GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA.

▼ M6

Dehra u karatteristiċi tal-ispeċijiet rakkomandati

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Dehra	Ċelloli uniċi mghawġin u milwijn	Ċelloli ovali fil-biċċa l-kbira uniċi	Vireg	Ktajjen ta' ċelloli ovali	Vireg
Qies (T × W) μm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volum ta' ċelloli (μm ³)/ċellola	40-60 ⁽¹⁾	60-80 ⁽¹⁾	40-50 ⁽¹⁾	30-40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Piż xott taċ-ċelloli (mg/ċellola)	2-3 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	1-2 × 10 ⁻⁸	2-3 × 10 ⁻⁹
Rata ta' tkabbir ⁽³⁾ (jum ⁻¹)	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0-2,4

⁽¹⁾ Imkejla b'kontatur tal-partiċelli elettroniku

⁽²⁾ Ikkalkolata mill-qies

⁽³⁾ Rata ta' tkabbir osservata l-aktar ta' spiss f'midjum OECD f'intensità ta' dawl ta'madwar 70 μE m⁻² s⁻¹ u 21 °C

Rakkomandazzjonijiet Speċifiċi dwar il-Kulturi u l-Immaniġġar tal-Ispeċijiet tal-Ittestjar Rakkomandati***Pseudokirchneriella subcapitata* u *Desmodesmus subspicatus***

Ġeneralment faċli żżomm dawn l-algi ħodor f'diversi midjums ta' kulturi. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi. Iċ-ċelloli ġeneralment huma solitarij, u l-kejliet tad-densità taċ-ċelloli jistgħu jsiru faċilment permezz ta' kontatur tal-frak elettroniku jew mikroskopju.

Anabaena flos-aquae

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinzamm kultura ewlenija. Huwa partikolarment importanti li jiġi evitat milli l-kultura tal-lott tghaddi l-fażi ta' tkabbir taz-zokk meta tiġgedded, l-irkupru huwa diffiċli f'dan il-punt.

Anabaena flos-aquae tiżviluppa aggregati ta' ktajjen ta' ċelloli mbejta. Id-daqs ta' dawn l-aggregati jista' jvarja skont il-kundizzjonijiet tal-kulturi. Jaf ikun meħtieġ li dawn l-aggregati jitqassmu meta l-ghadd tal-mikroskopju jew kontatur tal-frak elettroniku jintuża għad-determinazzjoni tal-bijomassa.

Is-sonikazzjoni tas-sottokampjuni tista' tintuża biex jinkisru l-ktajjen biex titnaqqas il-varjabbiltà tal-ghadd. Sonikazzjoni itwal milli meħtieġ sabiex jinkisru l-ktajjen f'tulijiet iqsar tista' teqred iċ-ċelloli. L-intensità u d-durata tas-sonikazzjoni għandhom ikunu l-istess għal kull trattament.

Għodd biżżejjed oqsma fuq l-emoċitometru (tal-inqas 400 ċellola) biex tghin tikkompensa għall-varjabbiltà. Dan sejjegħ itejjeb l-affidabbiltà tad-determinazzjonijiet tad-densità mikroskopika.

Jista' jintuża kontatur elettroniku tal-partiċelli għad-determinazzjoni tal-volum ta' ċelloli totali ta' Anabaena wara t-tkissir tal-ktajjen taċ-ċelloli b'sonifikazzjoni b'attenzjoni. L-enerġija ta' sonifikazzjoni għandha tiġi aġġustata biex jiġi evitat it-txifkil taċ-ċelloli.

Uża mikser b'vortici jew metodu xieraq simili biex tiżgura li s-sospensjoni tal-alga uzata biex tinokula r-riċipjenti tat-test tithallat sew u tkun omoġenja.

▼ **M6**

Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitqieghdu fuq mejda b'mikser orbitali jew reċiprokat b'madwar 150 rivoluzzjoni fil-minuta. Inkella, jistgħu jiġu aġitati b'mod intermittenti biex titnaqqas it-tendenza ta' Anabaena li tiffirma ċapep. Jekk ikun hemm ċapep, għandha tinghata attenzjoni biex jintlaħqu kampjuni rappreżentattivi għall-kejl tal-bijomassa. Jaf tkun hemm bżonn ta' aġitazzjoni qawwija qabel il-kampjunar biex jiġu diżintegrati ċ-ċapep ta' alga.

Synechococcus leopoliensis

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi.

Synechococcus leopoliensis tikber bħala ċelloli f'forma ta' vireg solitarji. Iċ-ċelloli huma żgħar ħafna, u dan jikkomplica l-użu ta' għadd mikroskopiku għall-kejl tal-bijomassa. Kontaturi elettronici tal-particelli mghammra għall-għadd ta' particelli sa daqs ta' madwar 1 µm huma siewja. Kejllet fluworometriċi in vitro huma applikabbli wkoll.

Navicula pelliculosa

Jistgħu jintużaw diversi midjums ta' tkabbir biex tinżamm kultura ewlenija. Informazzjoni dwar midjums xierqa hija disponibbli mill-kollezzjonijiet ta' kulturi. Kun af li f'dan il-midjum huwa mehtieg is-silikat.

Navicula pelliculosa tista' tiffirma aggregati f'ċerti kundizzjonijiet ta' tkabbir. Minhabba l-produzzjoni ta' lipidi, iċ-ċelloli algali għandhom it-tendenza li kultant jakkumulaw fir-rita tal-wieċ. F'ċerti ċirkostanzi jridu jittiehdu miżuri speċjali meta jittiehdu sottokampjuni għad-determinazzjoni tal-bijomassa sabiex jinkisbu kampjuni rappreżentattivi. Jaf ikun mehtieg thawwid bis-saħħa, eż. permezz ta' mikser b'vortici.

▼ **M6***Appendiċi 3***Idjums tat-tkabbir**

Jista' jintuza wiehed miż-żewġ midjums tat-tkabbir li ġejjin:

— Midjum tal-OECD: Midjum oriġinali tat-TG 201 tal-OECD, skont l-ISO 8692 ukoll

— US. AAP tal-midjum tal-EPA, skont l-ASTM ukoll.

Meta jiġu ppreparati dawn il-midjums, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi ta' reagent jew grad analitiku u ilma dejonizzat.

Kompożizzjonijiet tal-midjum AAP (US. EPA) u l-midjum OECD TG 201.

Komponent	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ · 6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ · 2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA · 2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ · 4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ · 2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ · 2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

Il-proporzjon ta' molar ta' EDTA mal-hadid taqbeż bi ftiit l-unità. Dan jevita l-precipitazzjoni tal-hadid u fl-istess hin, il-kelazzjoni ta' jonji tal-metall tqil tiġi minimizzata.

Fit-test bid-dijatomu *Navicula pelliculosa*, iż-żewġ midja jridu jkunu supplimentati b'Na₂SiO₃ · 9H₂O sabiex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 1,4 mg Si/l.

▼ M6

Il-pH tal-midjum jinkiseb f'ekwilibriju bejn is-sistema ta' karbonat tas-sistema tal-midjum u l-pressjoni parzjali tas-CO₂ fl-arja atmosferika. Relazzjoni approssimattiva bejn il-pH f'25 °C u l-konċentrazzjoni ta' bikarbonat molar hi ja:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11,30 + \log[\text{HCO}_3]$$

B'15 mg NaHCO₃/l, $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (midjum tal-EPA tal-Istati Uniti) u b'50 mg NaHCO₃/l, $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (midjum ta' OECD).

Kompożizzjoni tal-elementi tal-midjums tat-test

Element	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Preparazzjoni tal-midjum OECD

Nutrijent	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija
Soluzzjoni ewlenija 1: makro nutrijenti	
NH ₄ Cl	1,5 g/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,2 g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,8 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,16 g/l
Soluzzjoni ewlenija 2: ħadid	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	64 mg/l
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mg/l
Soluzzjoni ewlenija 3: elementi tat-traċċi	
H ₃ BO ₃	185 mg/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	415 mg/l
ZnCl ₂	3 mg/l

▼ **M6**

Nutrijent	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l
Soluzzjoni ewlenija 4: bikarbonat	
NaHCO_3	50 g/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Sterilizza s-soluzzjoni ewlenija b'filtrazzjoni tal-membrana (dijametru medju tal-pori ta' 0,2 μm) jew b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15 min). Ahżen is-soluzzjonijiet fid-dlam f'4 °C.

Tagħmilx awtoklavazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin 2 u 4, iżda sterilizzahom b'filtrazzjoni tal-membrana.

Ipprepara midjum tat-tkabbir billi żżid volum xieraq tas-soluzzjonijiet elwenin 1-4 mal-ilma:

Żid 500 ml ilma sterilizzat:

10 ml soluzzjoni ewlenija 1

1 ml soluzzjoni ewlenija 2

1 ml soluzzjoni ewlenija 3

1 ml soluzzjoni ewlenija 4

Żid sakemm isiru 1 000 ml bl-ilma sterilizzat.

Halli biżżejjed hin biex tekwilibrija l-midjum mas- CO_2 atmosferiku, jekk ikun meħtieġ billi ddahħal b'żiejaq tal-arja sterili u ffiltrati għal xi sigħat.

Preparazzjoni tal-midjum EPA tal-Istat Uniti

1. Żid 1 ml ta' kull soluzzjoni ewlenija f'2.1-2.7 għal madwar 900 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat u mbagħad hallat sa litru (1).
2. Is-soluzzjonijiet ewlenin tal-makronutrijenti jiġu prodotti billi jinħallu dawn li ġejjin f'500 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. Ir-reagenti 2.1, 2.2, 2.3, u 2.4 jistgħu jiġu kkombinati f'soluzzjoni ewlenija waħda.

2.1	NaNO_3	12,750 g.
2.2	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,082 g.
2.3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,205 g.
2.4	Soluzzjoni Ewlenija tal-Mikronutrijenti (ara 3).	
2.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,350 g.
2.6	K_2HPO_4	0,522 g.
2.7	NaHCO_3	7,500 g.
2.8	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Ara n-Nota 1

▼ M6

Nota 1: Uża għal speċijiet tat-test tad-dijatoma biss. Tista' tizzied direttament (202,4 mg) jew permezz ta' soluzzjoni ewlenija biex tingħata konċentrazzjoni ta' 20 mg/l Si fil-midjum.

3. Is-soluzzjoni ewlenija tal-mikronutrijenti tiġi prodotta billi jinħallu dawn li ġejjin f'500 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat:

3.1	H ₃ BO ₃	92,760 mg.
3.2	MnCl ₂ · 4H ₂ O	207,690 mg.
3.3	ZnCl ₂	1,635 mg.
3.4	FeCl ₃ · 6H ₂ O	79,880 mg.
3.5	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714 mg.
3.6	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3,630 mg.
3.7	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,006 mg.
3.8	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	150,000 mg. [Disodium (Ethylenedinitrilo) tetraacetate].
3.9	Na ₂ SeO ₄ · 5H ₂ O	0,005 mg Ara n-Nota 2.

Nota 2: Uża biss f'midjum għall-kulturi ewlenin tal-ispeċijiet ta' dijatomi.

4. Aġġusta l-pH għal $7,5 \pm 0,1$ b'0,1 N jew 1,0 N NaOH jew HCl.
5. Iffiltra l-midjums f'kontenitur sterili jew permezz ta' filtru tal-membrana ta' 0,22 µm jekk ser jintuża kontatur tal-partiċelli jew filtru ta' 0,45 µm jekk mhux ser jintuża kontatur tal-partiċelli.
6. Aħżen il-midjum fid-dlam f'madwar 4 °C sakemm jintuża.

▼ **M6***Appendiċi 4***Eżempju ta' proċedura għall-kulturi tal-algi****Osservazzjonijiet ġenerali**

Il-fini tal-kulturi abbazi tal-proċedura li ġejja huwa li jinkisbu kulturi algali għat-testijiet tat-tossiċità.

Uża metodi xierqa biex tiżgura li l-kulturi algali mhumiex infettati b'batterji. Il-kulturi akseniċi jistgħu jkunu rakkomandabbli iżda għandhom jiġu stabbiliti u użati kulturi unialgali.

L-operazzjonijiet kollha għandhom jitwettqu f'kundizzjonijiet sterili sabiex tiġi evitata kontaminazzjoni b'batterji u algi ohra.

Tagħmir u materjali

Ara taht il-metodu ta' ttestjar: Apparat.

Proċeduri għall-kisba ta' kulturi algali*Preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tan-nutrijenti (midjums):*

Il-melħ kollu tan-nutrijenti tal-midjum huwa ppreparat bħala soluzzjonijiet ewlenin ikkonċentrati u maħżuna fid-dlam u l-kesha. Dawn is-soluzzjonijiet huma sterilizzati b'filtrazzjoni jew b'awtoklavazzjoni.

Il-midjum jithejja billi jiżdied l-ammont xieraq tas-soluzzjoni ewlenija biex jiġi sterilizzat l-ilma distillat, filwaqt li tinghata attenzjoni li ma ssehh ebda infezzjoni. Għal midjum solidu, jiżdied 0,8 fil-mija ta' agar.

Kultura ewlenija:

Il-kulturi ewlenin huma kulturi algali li huma ttrasferiti b'mod regolari lejn midjum ġdid biex jaġixxu bħala materjal tat-test inizjali. Jekk il-kulturi ma jintużawx b'mod regolari, dawn jiferrxu f'tubi agari mżerżqa. Dawn huma ttrasferiti lejn midjum ġdid tal-inqas darba kull xahrejn.

Il-kulturi ewlenin jitkabbru fi flasks konikali li fihom l-midjum xieraq (volum ta' madwar 100 ml). Meta l-algi jkunu inkubati f'20 °C b'illuminazzjoni kontinwa, huwa mehtieg trasferiment kull ġimgha.

Matul it-trasferiment, ammont ta' kultura "qadima" huwa ttrasferit b'pipetti sterili fi flixkun ta' midjum ġdid, biex b'hekk bl-ispeċijiet li jikbru malajr, il-konċentrazzjoni inizjali hija madwar 100 darba iżgħar mill-kultura l-qadima.

Ir-rata ta' tkabbir ta' speċi tista' tiġi ddeterminata mill-kurva tat-tkabbir. Jekk dan ikun magħruf, huwa possibbli li tiġi stmata d-densità li biha għandha tiġi ttrasferita fil-midjum il-ġdid. Dan għandu jsir qabel ma l-kultura tilhaq il-fażi tal-mewt.

Prekultura:

Il-prekultura hija maħsuba biex tagħti ammont ta' algi xierqa għall-inokulazzjoni tal-kulturi tat-test. Il-prekultura hija inkubatur fil-kundizzjonijiet tat-test u użata meta tkun qiegħda tikber b'mod esponenzjali, normalment wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' 2 sa 4 ijiem. Meta l-kulturi algali jkun fihom ċelloli deformati jew anormali, dawn għandhom jiġu skartati.

▼ M6

Appendiċi 5

Analizi tad-dejta skont ir-rigressjoni nonlineari

Kunsiderazzjonijiet ġenerali

Ir-rispons f'testijiet algali u testijiet tat-tkabbir mikrobjali oħra — tkabbir tal-bijomassa — huwa min-natura tiegħu varjabbli kontinwu jew metriku — rata ta' proċess jekk tintuża rata ta' tkabbir u huwa integrali maż-żmien jekk tintgħażel il-bijomassa. It-tnejn huma referenzjati għar-rispons medju korrispondenti tal-kontrolli mhux esposti tar-repliki li juru rispons massimu għall-kundizzjonijiet imposti — b'dawl u temperatura bħala fatturi determinanti prinċipali tat-test algali. Is-sistema hija distribwita jew omoġenja u l-bijomassa tista' tidher bħala kontinwazzjoni mingħajr konsiderazzjoni taċ-ċelloli individwali. Id-distribuzzjoni tal-varjanza tat-tip ta' rispons għal tali sistema hija relatata unikament mal-fatturi sperimentali (ġeneralment deskritti mil-log-normali jew distribuzzjonijiet normali tal-izball). Dan b'kuntrast għar-risponsi tal-bijomassa tipiċi b'dejta kwantali għal liema t-tolleranza (ġeneralment iddistribwita b'mod binomjali) tal-organiżmi individwali li hafna drabi huma supponuti li huma komponent tal-varjanza dominanti. Hawnekk ir-risponsi tal-kontroll huma zero jew fil-livell ta' sfond.

Fis-sitwazzjoni mhux ikkumplikata, ir-rispons normalizzat jew relattiv, r , jonqos monotonikament minn 1 (l-ebda inibizzjoni) sa 0 (inibizzjoni ta' 100 fil-mija). Wiehed għandu jinnotta li r-risponsi kollha għandhom żball assoċjat magħhom u li l-inibizzjonijiet negattivi evidenti jistgħu jiġu kkalkolati bħala riżultat ta' żball każwali biss.

Analizi ta' rigressjoni

Mudelli

Analizi ta' regressjoni timmira li tiddekrivi kwantitattivament il-kurva konċentrazzjoni-rispons fil-forma ta' funzjoni matematika regressjoni $Y = f(C)$ jew aktar ta' spiss $F(Z)$ fejn $Z = \log C$. Użata inversament $C = f^{-1}(Y)$ thalli l-kalkolu tal-figuri EC_x li jinkludi l- EC_{50} , EC_{10} u EC_{20} , u l-95 % tagħhom ta' limiti ta' kunfidenza. Diversi forom matematiċi funzjonali sempliċi taw prova li jiddeskrivju b'suċċess ir-relazzjonijiet bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons miksuba fit-testijiet ta' inibizzjoni tat-tkabbir tal-alga. Il-funzjonijiet jinkludu eż. l-ekwazzjoni loġistika, l-ekwazzjoni asimmetrika ta' Weibull u l-funzjoni tad-distribuzzjoni normali tal-log, li huma kollha kurvi ta' sigmoid li asimptotikalment joqorbu lejn iż-zero għal $C \rightarrow 0$ u waħda għall-infinit ta' $C \rightarrow \infty$.

L-użu tal-mudelli tal-funzjoni tal-livell limitu kontinwu (eż. il-mudell ta' Kooijman “għall-inibizzjoni tat-tkabbir tal-popolazzjoni” Kooijman et al. 1996) ġie propost dan l-aħħar jew alternattiv għall-mudelli asintotiċi. Dan il-mudell jassumi xejn effetti f'konċentrazzjonijiet taħt ċertu livell, EC_0+ , li huwa smat permezz ta' estrapolazzjoni tar-relazzjoni rispons-konċentrazzjoni biex tinterċetta l-bażi ta' konċentrazzjoni permezz tal-użu ta' funzjoni kontinwa li ma hijiex differenzjabbli fil-punt tat-tluq.

Kun af li l-analizi tista' tkun sempliċi minimizzazzjoni tas-somom tal-kwadri residwi (jekk tiġi supponuta varjanza kostanti) jew kwadri ppeżati jekk l-eterogeneità tal-varjanza tiġi kkompensata.

Proċedura

Il-proċedura tista' tiġi deskritta kif ġej: Aghzel ekwazzjoni funzjonali xierqa, $Y = f(C)$, u adattaha għad-dejta permezz ta' rigressjoni nonlineari. Idealment għandek tuża l-kejl minn kull flask individwali iktar milli l-medji tar-repliki, sabiex testratta kemm jista' jkun informazzjoni mid-dejta. Jekk il-varjanza tkun għolja,

▼ M6

min-naħa l-oħra, l-esperjenza Prattika tissuggerixxi li l-medji tar-repliki jistghu jipprovdu stima matematika iktar robusta li hija inqas influwenzata minn żbalji sistematiċi fid-dejta, milli b'kull punt ta' dejta individwali miżmum.

Ipplottja l-kurva mdahħla u d-dejta mkejla u eżamina jekk il-kurva mdahħla hijiex xierqa. Analizi tar-residwi tista' tkun għodda partikolarment utli għal dan il-ghan. Jekk ir-relazzjoni funzjonali magħżula biex jiddahħal ir-rispons tal-konċentrazzjoni ma tiddekrivix sew il-kurva kollha jew xi parti essenzjali tagħha, bħar-rispons f'konċentrazzjonijiet baxxi, aghżel opzjoni ta' dħul tal-kurva oħra — eż. kurva mhux asimmetrika bħall-funzjoni ta' Weibul minflok waħda simetrika. L-inibizzjonijiet negattivi jistghu jkunu problema, pereżempju bil-funzjoni tad-distribuzzjoni normali tal-log li bl-istess mod titlob funzjoni tar-rigressjoni alternattiva. Mhuwiex rakkomandat li tassenja valur zero jew pożittiv żgħir għal tali valuri negattivi peress li dan ifixkel id-distribuzzjoni tal-iżball. Jista' jkun adegwat li jsir dħul ta' kurvi separati fuq partijiet tal-kurva bħall-parti ta' inibizzjoni baxxa sabiex jiġu stmati figuri EC_{lowx} . Ikkalkula mill-ekwazzjoni mdahħla (permezz ta' "estimazzjoni inversa", $C = f^{-1}(Y)$), stimi karatteristiċi ta' punt EC_x 's, u rraporta bħala minimu l- EC_{50} u wiehed jew żewġ stimi EC_{lowx} . L-esperjenza mill-ittestjar Prattiku wriet li l-preċiżjoni tat-test algali normalment tippermetti stima raġonevolment preċiża fil-livell tal-inibizzjoni ta' 10 % jekk il-punti ta' dejta jkunu suffiċjenti — sakemm ikun hemm stimolazzjoni f'konċentrazzjonijiet baxxa bħala fattur ta' konfużjoni. Il-preċiżjoni ta' stima EC_{20} hija ta' spiss konsiderevolment aħjar minn dik ta' EC_{10} , għaliex l- EC_{20} huwa generalment ippożizzjonat fuq il-parti bejn wiehed u iehor lineari tal-kurva ċentrali konċentrazzjoni rispons. Xi drabi huwa diffiċli li ssir interpretazzjoni ta' EC_{10} minhabba stimolazzjoni ta' tkabbir. Għalhekk, filwaqt li l- EC_{10} hija normalment miksuba b'akkurezza suffiċjenti, huwa wkoll rakkomandat li tirraporta dejjem l- EC_{20} .

Fatturi ta' ppeżar

Il-varjanza sperimentali, generalment mhijiex konsistenti u generalment tinkludi komponenti proporzjonali, u għalhekk normalment titwettagħ rigressjoni ppeżata b'mod vantaġġjuż. Il-fatturi ta' ppeżar għal tali analizi, normalment huma preżunti bħala proporzjonalment inversi għall-varjanza:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Hafna programmi ta' rigressjoni jippermettu l-opzjoni ta' analizi ta' rigressjoni ppeżata b'fatturi ta' ponderazzjoni elenkati f'tabella. B'mod konvenjenti l-fatturi ta' ppeżar għandhom jiġu normalizzati billi dawn jiġu mmultiplikati b' $n/\sum w_i$ (n huwa n-numru ta' punti ta' dejta) biex b'hekk it-total tagħhom ikun wiehed.

Risponsi normalizzanti

In-normalizzazzjoni permezz tar-rispons ta' kontroll medju twassal għal xi problemi ewlenin u tagħti lok għal struttura ta' varjanza pjuttost ikkumplikata. Meta wiehed jaqşam ir-risponsi bir-rispons ta' kontroll medju għall-kisba tal-percentwal ta' inibizzjoni, jintroduċi żball addizzjonali kkawżat mill-iżball fil-medja tal-kontroll. Sakemm dan l-iżball ma jkunx negligibbilment żgħir, il-fatturi ta' ppeżar fil-limiti ta' rigressjoni u kunfidenza għandhom jiġu korretti għall-kovarjanza mal-kontroll (Draper u Smith, 1981). Kun af li l-preċiżjoni għolja fuq ir-rispons ta' kontroll medju stmat huwa importanti sabiex titnaqqas il-varjanza globali għar-rispons relattiv. Din il-varjanza hija kif ġej:

(Is-sottoskritt i jirreferi għal-livell ta' konċentrazzjoni u s-sottoskritt 0 għall-kontrolli)

$$Y_i = \text{Rispons relattiv} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼ **M6**

bil-varjanza $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$

u għax $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ u $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

b'dejta normalment distribwita u m_i u m_0 repliki: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

il-varjanza totali tar-rispons relattiva, Y_i għalhekk issir:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

L-iżball fil-medja tal-kontroll huwa proporzjonat b'mod invers għall-għerq kwadrat tan-numru tar-repliki tal-kontroll bħala medja, u xi drabi jista' jkun iġġustifikat biex jinkludi dejta storika u b'dan il-mod inaqas bil-qawwi l-iżball. Proċedura alternattiva mhijiex dik li tiġi nnormalizzata d-dejta u jitqieghdu risponsi assoluti inkluża d-dejta tar-rispons ta' kontroll iżda li jiġi introdott valur tar-rispons ta' kontroll bħala parametru addizzjonali li għandu jiddahhal b'rigressjoni nonlineari. B'ekwazzjoni tar-rigressjoni b'2 parametri tas-soltu, dan il-metodu jeħtieġ li jiddahhlu 3 parametri u, għalhekk, jirrekjedi iktar punti ta' dejta minn rigressjoni nonlineari fuq id-dejta li hi normalizzata permezz ta' rispons predeterminat ta' kontroll.

Intervalli ta' kunfidenza inversi

Il-kalkolu tal-intervalli ta' kunfidenza tar-rigressjoni mhux lineari minn stima inversa huwa pjuttost kumpless u mhux opzjoni standard disponibbli f'pakketti ta' programmi statistiċi tal-kompjuter ordinarji. Limiti ta' kunfidenza approssimattivi jistgħu jiġu miksuba ma' programmi standard ta' rigressjoni non-lineari ma' riparametrizzazzjoni (Bruce u Versteeg, 1992), li jinvolvu l-kitba mill-ġdid tal-ekwazzjoni matematika bil-punti ta' stima mixtieqa, eż. $1-EC_{10}$ u $1-EC_{50}$ bħala parametri li għandhom jiġu stmati. (Halli l-funzjoni tkun $I = f(\alpha, \beta, \text{Koncentrazzjoni})$ u uża r-relazzjonijiet tad-definizzjoni $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ u $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ għas-sostitut $f(\alpha, \beta, \text{koncentrazzjoni})$ b'funzjoni ekwivalenti $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentrazzjoni})$).

Kalkulazzjoni aktar diretta (Andersen et al, 1998) hija magħmula permezz taż-żamma tal-ekwazzjoni originali u l-użu ta' espansjoni ta' Taylor madwar il-medji ta' r_i u r_0 .

Dan l-aħhar il-“metodi boot strap” saru popolari. Tali metodi jużaw id-dejta mkejla u kampjunar mill-ġdid frekwenti mmexxi minn ġeneratur tan-numri każwali biex tiġi stmata d-distribuzzjoni tal-varjanza empirika.

REFERENZI

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.



C.4. DETERMINAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ “LESTA”

PARTI I. KONSIDERAZZJONIJIET ĠENERALI

I.1. INTRODUZZJONI

Sitt metodi tat-ġtestijiet huma deskritti li jippermettu l-ġhażla tal-kimiċi għal biodegradabbiltà lesta f; medja akwea arobika:

- (a) Karbonju Organiku Mdewweb (DOC) Bit-Tnehhija tal-Kulur (Metodu °C.4-A)
- (b) Ġhażla Modifikata OECD – DOC Bit-Tnehhija tal-Kulur (Metodu °C.4-B)
- (c) Evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju (CO₂) (Test Sturm modifikat (Metodu °C.4-C)
- (d) Respirometrija Manjometrika (Metodu °C.4-D)
- (e) Flixkun magħluq (Metodu °C.4-E)
- (f) MITI (Ministeru tal-Kummerċ Internazzjonali u l-Industrija – Gappun) (Metodu °C.4-F)

Konsiderazzjonijiet ġenerali u komuni għas-sitt testijiet kollha huma mogħtija fil-Parti I tal-metodu. Punti speċifiċi għal metodi individwali huma mogħtija fil-Partijiet II sa VII. L-annessi fihom definizzjonijiet, formuli u materjal ta' gwida.

Eżerċizzju ta' tqabbil inter-laboratorju OECD, magħmul fil-1988, kien wera li l-metodi jagħtu riżultati konsistenti. B'danakollu, jiddependi mill-karatteristiċi fiżiċi tal-sustanza tat-test, wiehded jew iehor mill-metodi jista jkun preferut.

I.2. SELEZZJONI TAL-METODU XIERAQ

Sabiex ikun magħżul il-metodu l-aktar xieraq, informazzjoni dwar is-solubbiltà tal-kimika, pressa tal-fwar u l-karatteristiċi ta' l-assorbazzjoni huma essenzjali. L-istruttura jew il-formula tal-kimika għandhom ikunu magħrufa sabiex ikun ikkalkolati l-valuri teoretiċi u/jew il-verifika tal-valuri mkejla tal-parametri, eż. ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, COD (ara l-Annessi I u II).

Kimiki tat-test li jinhallu fl-ilma għal mill-anqas 100 mg/l jistgħu ikunu assessjati bil-metodi kollha, basta li dawn ma jkunux volatili u mhux-assorbanti. Għal dawk il-kimiki li jinhallu bilmod fl-ilma, li huma volatili jew assorbanti, metodi xierqa huma indikati fit-Tabella 1. Il-manjera li biha l-kimiċi li jinhallu bilmod fl-ilma u kimiki volatili jistgħu ikunu ittratti kif deskritt fl-Anness III. Kimiki moderatament volatili jistgħu ikunu ittestjati bil-metodu DOC tat-Tnehhija tal-Kulur jekk ikun hemm spazzju biż-żejjed tal-gass fir-reċipjenti tat-test (li għandhom ikunu magħluqa sewwa). F'dan il-każ, kontrol abjotiku jista jkun stabbilit sabiex jippermetti għal xi telf fiżiku.



Tabella 1

Applikabbiltà tal-metodi tat-test

Test	Metodu analitiku	Adattabbiltà għal tahlitiet li huma:		
		Jinhallu f'it	volatili	assorbenti
DOC Tnehhija tal-kulur	Karbonju organiku mdewweb	—	—	+/-
Mod. OECD Tnehhija tal-kulur	Karbonju organiku mdewweb	—	—	+/-
Evoluzzjoni CO ₂	Respirometrija: Evoluzzjoni CO ₂	+	—	+
Respirometrija manometrika	Respirometrija manometrika: konsum ta' l-ossigenu	+	+/-	+
Flixxun magħluq	Respirometrija: ossigenu mdewweb	+/-	+	+
MITI	Respirometrija: konsum ta' l-ossigenu	+	+/-	+

Informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relattivi ta' komponenti magħguri tal-materjal tat-test hija meħtieġa għall-interpretazzjoni tar-riżultati akkwistati, speċjalment meta r-riżultati huma baxxi jew marginali.

Informazzjoni dwar it-tossicità tal-kimika tat-test mal-bakterja (l-Anness IV) tista tkun ferm utili għall-għażla tal-koncentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista tkun essenzjali għall-interpretazzjoni tajba tal-valuri tal-biodegradazzjoni baxxa.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sabiex tkun verifikata l-proċedura, kimiċi ta' referenza li jilhqgħu l-kriterja għal biodegradabbiltà faċli huma ittestjati billi jkun hemm garafina xierqa b'mod parallel mal-provi nomali tat-test.

Kimiċi xierqa huma l-anilin (iddistillat frisk), l-aċetat tas-sodju u l-benzoat tas-sodju. Dawn il-kimiċi ta' referenza kollhom jkollhom degradazzjoni b'dawn il-metodi meta l-ebda inoculum ma jkun deliberatament miżjud.

Huwa suġġerit li kika ta' referenza għandha tkun imfittxija li jkollha biodegradabbiltà faċli imma meħtieġa b'zieda ma l-inoculum. Il-ftalat ta' l-idroġenu tal-putassa kien proponut imma aktar evidenza jeħtieġ li tkun akkwistata b'din is-sustanza qabel ma tista tkun aċċettata bħal sustanza ta' referenza.

Fit-testijiet respirometriċi, il-komposti li jkun fihom in-nitroġenu jistgħu jaffettwaw l-akkwist ta' l-ossigenu minhabba n-nitrifikazzjoni (ara l-Annessi II u V).

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODI TAT-TEST

Tahlita, jew sospensjoni, tas-sustanza tat-test f'medja minerali, hija innokulata u inkubata permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, fid-dlam jew f'dawl baxx hafna. L-ammont ta' DOC fit-tahlita tat-test minhabba l-inoculum għandu jinżamm baxx kemm jista jkun possibbli imqabbel ma l-ammont ta' DOC minhabba s-sustanza tat-test. Għandu jkun hemm margġini għall-attività endoġenea ta' l-inoculum billi jkunu mwettqa testijiet paralleli fl-imbjank bl-inoculum imma mingħajr is-sustanza tat-test, għalkemm l-attività endoġenea ta' ċelloli fil-preżenta tas-sustanza ma tkunx eżattament taqbel ma dik fil-kontroll endoġeneu. Sustanza ta' referenza tkun utillizzata b'mod parallel għall-verifika ta' l-operazzjoni tal-proċeduri.

▼B

Generalment, degradazzjoni hija segwita bid-determinazzjoni tal-parametri, bħalma huma DOC, produzzjoni CO_2 bl-akkwist ta' l-ossigenu, u l-kejl ikun meħud f'intervalli ta' spiss suffiċjenti sabiex jippermettu l-identifikazzjoni tal-bidu u tat-tmiem tal-biodegradazzjoni. B'respirometri awtomatiċi, il-kejl ikun kontinwu. DOC ta' kultant huwa mkejjet b'zieda ma parametru ieħor, imma dan normalment isehh biss fil-bidu u fit-tmiem tat-test. Analizi kimika speċifika tista wkoll tkun użata għall-assessjar tad-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test, u sabiex tkun determinata l-konċentrazzjoni ta' xi sustanzi intermedji iffurmati (obligatorja fit-test MITI).

Normalment, it-test idum 28 jum. B'danakollu, t-testijiet jistgħu jieqfu qabel it-28 jum, i.e. malli l-kurva tal-bijodegradazzjoni tkun lahqet il-quċċata lixxa għal mill-anqas 3 determinazzjonijiet. It-testijiet jistgħu wkoll ikunu mtawla lill hinn minn 28 jum meta l-kurva turi li l-biodegradazzjoni tkun bdiet imma l-quċċata lixxa ma tkunx intlahqet fil-jum 28.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

1.5.1. Reproduċibbiltà

Minhabba n-natura tal-biodegradazzjoni u tal-popolazzjoni mħallta tal-bakterja użata bħala inocula, determinazzjonijiet għandhom jitwettqu mill-anqas b'mod doppju.

Hija esperjenza komuni li akbar ma tkun il-konċentrazzjoni tal-mikro-organizmi inizjalment miżjuda mal-medja tat-test, aktar tkun żgħira l-varjazzjoni bejn ir-repetizzjonijiet. Testijiet biċ-crieki kienu wkoll urew li kien hemm varjazzjonijiet kbar bejn ir-riżultati akkwistati minn laboratorji differenti, imma ftehim tajjeb huwa normalment akkwistat b'komposti faċilment biodegradabbli.

1.5.2. Validità tat-test

Test huwa meqjus bħala validu jekk id-differenza ta' l-estremi fil-valuri tar-repetizzjoni tat-tnehhija tal-kimika tat-test fil-quċċata lixxa, fit-tmiem tat-test jew fit-tmiem tas-sessjoni ta' 10 ijiem, kif xieraq, hija anqas minn 20 % u jekk il-perċentwal tad-degradazzjoni tas-sustanza ta' referenza jkun lahaq il-livell għal biodegradabbiltà faċli sa 14-il jum. Jekk wahda minn daww il-kondizzjonijiet ma tkunx milfuqha, it-test għandu jkun repetut. Minhabba l-limitazzjoni stretta tal-metodi, valuri baxxi mhux neċessarjament ifissru li s-sustanza tat-test ma tkun biodegradabbli permezz tal-kondizzjonijiet ambjentali, imma tindika li aktar xogħol għandu jsir sabiex tkun stabbilita l-biodegradabbiltà.

Fit-test tat-tossicità, li jkun fih kemm it-test tas-sustanza u kimika ta' referenza, anqas minn 35 % degradazzjoni (ibbażat fuq DOC) jew anqas minn 25 % (ibbażata fuq ThOD jew ThCO_2) li tkun seħhet matul l-14-il jum, il-kimika tat-test tista tkun meqjusa bħala inibitriċi (ara wkoll l-Anness IV). Is-serje ta' testijiet għandu jkun repetut, jekk possibbli bl-użu ta' konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test u/jew ta' konċentrazzjoni aktar għolja ta' l-inoculum, imma mhux aktar minn 30 mg solidi/litru.

1.6. PROCEDURA ĠENERALI UPREPARAZZJONIJET

Il-kondizzjonijiet ġenerali applikabbli għat-testijiet huma riassunti fit-Tabella 2. Apparat u l-kondizzjonijiet sperimentali tal-kondizzjonijiet li jappartjeni speċifikament għal test individwali huma deskritti aktar tard tahi l-intestatura għall-dak it-test.



Tabella 2

Kundizzjonijiet tat-test

Test	DOC Tnehhija tal-kulur	Evoluzzjoni CO ₂	Respirometrija manometrika	Għażla modifikati	Flixxun magħluq OECD	MITI (1)
Konċentrazzjoni ta' Sustanza tat-test hija bħ						
ala mg/l			100		2-10	100
mg DOC/l	10-40	10-20	10-40			
mg ThOD/l			50-100		5-10	
Konċentrazzjoni ta' l-Inoculum (f'ċelloli/l, b'mod approssimattiv)	≤ 30 mg/l SS jew ≤ 100 ml effluwent/l (10 ⁷ - 10 ⁸)			0,5 ml affluwent sekondarju/l (10 ⁵)	≤ 5 ml ta' l-effluwent/l (10 ⁴ - 10 ⁶)	30 mg/l SS (10 ⁷ - 10 ⁸)
Konċentrazzjoni ta' l-elementi fil-medja minerali (fi mg/l)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					preferibbilment 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Dissolved Organic Carbon
(Karbonju organiku mdewweb)

ThOD = Theoretical Oxygen Demand
(Talba teoretika ta' l-ossigenu)

SS = Solidi sospizi

I.6.1. Ilma tat-trattib

Ilma deonizzat jew distillat, hieles minn konċentrazzjonijiet inibitorji ta' sustanzi tossiċi (eż. Cu⁺⁺ jonji) huwa wżat. Dan għandu jkun fih mhux aktar minn 10 % tal-kontenut tal-karbonju organiku introdott bil-materjal tat-test. Il-purità għolja ta' l-ilma tat-test hija mehtieġa sabiex telimina l-valuri għolja fl-imbjank. Kontaminazzjoni tista' tirriżulta minn impuritajiet inerenti u wkoll minn reżini ta' l-iskambju tal-jonji u l-materjal lysed mill-bakterja u l-algae. Għal kull serje ta' testijiet għandek tuża lott wiehed biss ta' ilma, i-verifikat bil-quddiem bl-analizi DOC. Tali verifika ma tkunx mehtieġa għat-test tal-flixxun magħluq, imma l-konsum ta' l-ossigenu ta' l-ilma għandu jkun baxx.

▼B**1.6.2. Tahlitiet bil-lest ta' komposti minerali**

Sabiex isiru t-tahlitiet tat-test, tahlitiet bil-lest tal-koncentrazzjonijiet xierqa jkunu maghmula minn komponenti minerali. Dawn it-tahlitiet bil-lest li ġejjin jistgħu jkunu wżati (bil-fatturi differenti tat-trattib) għall-metodu DOC Tnehhija bil-kulur, Għażla OECD Modifikata, Evoluzzjoni CO₂, Respirometrija Manometrika, it-test tal-Flixxkun Magħluq.

Il-fatturi tat-trattib u, għat-test MITI, il-preparazzjoni speċifika tal-medja minerali, huma mogħtija taħt l-intestaturi tat-testijiet speċifiċi.

Tahlitiet bil-lest:

Ipprepara t-tahlitiet bil-lest li ġejjin, bl-użu ta' reaġenti ta' grad analitiku.

a	Monopotassium dihydrogen orthophosphate, KH ₂ PO ₄	8,50 g
	Dipotassium monohydrogen orthophosphate, K ₂ HPO ₄ Disodium	21,75 g
	monohydrogen orthophosphate dihydrate Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O Klorid	33,40 g
	ta' l-ammonium NH ₄ Cl	0,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal sa 1 litru. Il-pH tat-tahlita għandu jkun 7,4.	
b	Klorid tal-kalċji, anidriju, CaCl ₂	27,50 g
	jew dihidrat tal-klorid tal-kalċju CaCl ₂ · 2 H ₂ O	36,40 g
	Dewweb fl-ilma u wassal sa litru	
c	Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, MgSO ₄ · 7 H ₂ O	22,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru	
d	Ħadid (III) eksaidrat tal-klorid, FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,25 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	

Nota: Sabiex tkun evitata l-htieġa li tkun ippreparata din is-soluzzjoni immedjetament qabel l-użu, zid qatra ta' HCL ikkoncentrat, jew 0,4 g melh disodju ta' l-aċidu ethylenediaminetetra-aċetiku (EDTA) kull litru.

1.6.3. Tahlitiet bil-lest ta' kimiċi

Per eżempju, dewweb 1-10 g, kif xieraq, tal-kimika tat-test jew ta' referenza, filma de-jonizzata u wassal sa litru meta s-solubbiltà teċċedi 1 g/l. Altrimenti, ipprepara t-tahlitiet bil-lest fil-medja minerali jew zid il-kimika direttament mal-medja minerali. Għat-trattament ta' kimiċi anqas solubbli, ara l-Anness III, imma fit-test MITI (il-Metodu °C.4-F), la s-solventi u l-anqas l-aġenti emulsifikanti m'għandhom ikunu wżati.

▼B

1.6.4. **Inocula**

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: hama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u hamrija jew minn tahlita ta' dawn. Għal testijiet tar-Repirometrija ta' l-Evoluzzjoni jew Manjometika DOC Tnehhija bil-Kulur, CO₂, jekk il-hama' attivata tkun użata, dan għandu jkun meħud minn impjant tat-trattament jew unità ta' skala ta' laboratorju li tirċieci predominantament drenaġġ domestiku. Kien instab li Inocula minn sorsi oħrajn tagħti tixrid aktar għoli tar-riżultati. Għall-ghazla OECD Modifikata u t-testijiet tal-Flixxun Magħluq, inoculum mingħajr il-frak tal-hama' aktar imdewwb huwa meħtieġ u s-sorsi preferita huwa l-effluwent sekondarju mill-impjant tat-trattament ta' l-ilma ta' l-iskart domestiku jew minn unità ta' skala ta' laboratorju. Għat-test MITI, l-inoculum huwa akkwistat minn tahlita ta' sorsi u huwa deskritt taħt l-intestatura ta' dan it-test speċifiku.

1.6.4.1. *Inoculum minn hama' attivata*

Igħbor kampjun minn hama' attivata friska mit-tank ta' l-arjazzjoni ta' l-impjant tat-trattament tad-drenaġġ jew minn unità ta' skala tal-laboratorju li predominantament jitratta d-drenaġġ domestiku. Warral il-partiċelli rozzi, jekk meħtieġ bil-filtrazzjoni minn passatur fin u wara dan zomm il-hama' f'mod erobiku.

B'mod alternattiv, halli joqġhod, jew inkella għaddi miċ-ċentrifuga (eż. fi 1 100 g għal 10 min.) wara t-tnehhija ta' xi partiċelli rozzi. Warrab is-supernatant. Il-hama tista tkun mahsula f'medja minerali. Issospendi l-hama ikkonċentrata f'medja minerali sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' 3-5 g solidi sospizi kull litru u imla bl-arja sakemm meħtieġ.

Il-hama' għandha tkun miġbura proporzjonalment minn impjant ta' xogħol konvenzjonali. Jekk il-hama jkun jeħtieġ li tingabar minn impjant ta' trattament qawwi, jew ikun mahsub li jkun fiha inibituri, din għandha tkun mahsula. Halliha toqġhod jew għaddi l-hama' sospiza mill-ġdid minn ċentrifuga wara li tkun imhallta sewwa, warrab is-supernatant u mill-ġdid erga issospendi l-hama' mahsula f'volum ieħor tal-medja minerali. Irrepeti din il-proċedura sakemm il-hama' tkun meqjusa b'hala hielsa minn substrata jew inibitur eċċessivi.

Wara li s-sopenzjoni shiha mill-ġdid tkun akkwistata, jew b'hama' mhux trattata, warrab il-pamkun immedjetament qabel l-użu għad-determinazzjoni tal-piż xott tas-solidi sospizi.

Alternattiva oħra hija li tkun omoġenizzata l-hama' attivata (3-5 g solidi sospizi kull litru). Il-hama' hija trattata f'hawwadi mekkaniku għal 2 minuti f'velocità medja. Halli l-hama' tal-hawwadi toqġhod għal 30 minuta jew aktar jekk hekk meħtieġ u ferra l-likwidu għall-użu b'hala inoculum bir-rata ta' 10 ml/l tal-medja minerali.

1.6.4.2. *Sorsi oħrajn ta' l-inoculum*

Dan jista jkun akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Igħbor kampjun frisk u zommu erobiku waqt it-trasport. Hallieh joqġhod għal siegħa jew iffiltra minn karta rozza tal-filtru u zomm l-effluwent imferra jew il-filtrat erobiku sakemm ikunu meħtieġa. Sa 100 ml ta' dan it-tip ta' inoculum jista jkun użat ma kull litru ta' medja.

▼B

Sors ieħor għall-inoculum hija l-ilma tal-wieċ ta' l-art. F'dan il-każ, iġbor kampjun xieraq mill-ilma tal-wieċ, eż. xmara, għadira, u żommu erobiku sakemm ikun meħtieġ. Jekk meħtieġ, ikkonċentra l-inoculum bil-fitrazzjoni jew biċ-ċentrifugazzjoni.

1.6.5. Pre-kondizzjonat ta' l-inocula

L-inocula tista tkun pre-kondizzjonata għall-kondizzjonijiet sperimentali, imma mhux pre-afattata għall-kimika tat-test. Il-pre-kondizzjonar jikkonsisti mill-arjazzjoni tal-ħama' attvita f'medja minerali jew effluwent sekondarju għal 5-7 tjiem fit-temperatura tat-test. Il-pre-kondizzjonar ta' kull tant itejjeb il-prċizzjoni tal-metodi tat-test bit-naqqis tal-valuri vojta. Huma meqjus bħala mhux neċessarju il-pre-kondizzjonar ta' l-inoculum MITI.

1.6.6. Kontrolli abjotiċi

Meta meħtieġ, għandek tivverifika d-degradazzjoni abjotika possibbli tas-sustanza tat-test bid-determinazzjoni tat-tnehhija ta' DOC, l-akkwist ta' l-ossigenu jew ta' l-evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju f'kontrolli sterili li ma jkun fihom l-ebda inoculum. Sterlizza bil-filtrazzjoni minn membrana (0,2 - 0,45 mikrometri) jew biż-żieda ta' sustanza tossika xierqa fil-konċentrazzjoni adatta. Jekk tkun użata l-membrana tal-filtrazzjoni, iġbor kampjuni b'mod axettiku għaž-żamma tal-isterilità. Sakemm l-assorbazzjoni tal-kimika tat-test ma tkunx diġa għet imwarrba minn qabel, testijiet li jkejlu l-biodegradazzjoni bħala t-tnehhija ta' DOC, speċjalment bl-inocula tal-ħama' attivita, għandhom jinkludu kontroll abjotiku li huwa innokulat u ivvelenat.

1.6.7. Numru ta' garafini

In-numru ta' garafini fi prova tipika huwa deskritt taħt l-intestaturi ta' kull wieħed mit-testijiet.

It-tip ta' garafina li ġej jista jkun użat:

- Sospenzjoni tat-test: li jkun fiha s-sustanza tat-test u l-inoculum
- Inoculumi fl-imbjank: li jkun fih biss l-inoculum
- Proċedura tal-kontroll: li jkun fiha s-sustanza ta' referenza u l-inoculum
- Kontroll ta' abjotiku sterili: sterili, li jkun fiha s-sustanza tat-test (ara I.6.6)
- Kontroll ta' l-adsorbazzjoni: li jkun fiha s-sustanza, l-inoculum u l-aġent sterilizzanti
- Kontroll tat-tossicità: li jkun fiha s-sustanza tat-test, is-sustanza ta' referenza u l-inoculum

Huwa mandatorju li d-determinazzjoni tas-sospenzjoni tat-test u l-imbjank ta' l-inoculum isehh b'mod parallell. Huwa rakommandabbli li jsiru d-determinazzjonijiet fil-garafini l-oħrajn b'mod parallell ukoll.

Dan jista, b'danakollu, mhux dejjem ikun possibbli. Assigura li kampjoni jew qari suffiċjenti jkunu mehuda sabiex jippermettu t-tnehhija perċentwali fl-ispażju ta' l-10 ijiem ta' l-assessjar.

▼B**I.7. DATA U EVALWAZZJONI**

Fil-kalkolu ta' D_t , id-degradazzjoni preċentwali, il-valuri medji tal-kejl duplikat tal-parametru fiż-żewġ reċipjenti tat-test u l-imbjank ta' l-inoculum, ikunu wżati. Dawn il-formuli huma stabbiliti fis-sezzjonijiet ta' hawn taht fit-testijiet speċifiċi. Il-korsa tad-degradazzjoni hija murija b'mod grafiku u l-perijodu ta' 10 ijiem huwa indikat. Ikkalkola u irrapporta l-perċentwal tat-tneħhija milhuq fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-valur tal-quċċata lixxa jew fit-tmiem tat-test, liema minnhom huwa xieraq.

Fit-testijiet respirometriċi, l-komposti li jkun fihom in-nitroġenu jistgħu jaffettwaw l-akkwist ta' l-ossiġenu minhabba n-nitrifikazzjoni (ara l-Annessi II u V).

I.7.1. Degradazzjoni mkjela permezz tad-determinazzjoni DOC

Id-degradazzjoni preċentwali D_t kull darba li kampjun ikun miġbur għandha tkun ikkalkolata b'mod separat għal kull waħda mill-garafini li jkun fihom is-sustanza tat-test bl-użu tal-valuri medji tal-kejn duplikat DOC sabiex il-validità tat-test tista tkun assessjata (ara I.5.2.). Hija ikkalkolata bl-użu ta' din l-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

meta:

D_t = % degradazzjoni fil-hin t ,

C_o = il-medja tal-bidu tal-konċentrazzjoni ta' DOC tal-kultura inokulata fil-medju li jkun fih is-sustanza tat-test (mg DOC/l),

C_t = il-medja tal-konċentrazzjoni ta' DOC tal-kultura innokulata fil-medju li jkun fih is-sustanza fil-hin t (mg DOC/l),

C_{bo} = il-medja tal-bidu tal-konċentrazzjonini ta' DOC fl-imbjank inokulata fil-medja minerali (mg DOC/l),

C_{bt} = il-medja tal-konċentrazzjoni ta' DOC fl-imbjank innokulata fil-medja minerali fil-hin t (mg DOC/l),

Il-konċentrazzjonijiet kollha huma mkejla b'mod sperimentali.

I.7.2. Degradazzjoni mkjela permezz ta' analiżi speċifika

Meta data analitika speċifika tkun disponibbli, wettaq il-kalkolazzjoni tal-biodegradazzjoni primarja minn:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

meta:

D_t = % degradazzjoni fil-hin t , normalment 28 jum,

S_a = ammont residwu tas-sustanza tat-test fil-medja inokulata fit-tmiem tat-test (mg),

S_b = l-ammont residwu tas-sustanza tat-test fit-test fl-imbjank bl-ima/medja li magħha tkun ġiet miżjuda biss is-sustanza tat-test (mg).

▼B**I.7.3. Degredazzjoni abjotika**

Meta jkun użat il-kontroll abjotiku sterili, wettaq il-kalkolazzjoni tal-perċentali tad-degradazzjoni abjotika bl-użu: % degradazzjoni abjotika

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

Meta:

$C_{s(o)}$ = DOC Il-konċentrazzjonini sterili tal-kontroll fil-jum 0

$C_{s(t)}$ = DOC Il-konċentrazzjonini sterili tal-kontroll fil-jum t

I.8. RAPPORTAĠĠ

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

- is-sustanzi tat-test u tar-referenza, u il-purità tagħhom,
- il-kondizzjoni tat-test,
- inoculum: is-sit(i) tan-natura u l-kampjunar, konċentrazzjonini u xi trattament ta' pre-kondizzjonar;
- il-proporzjon u n-natura tal-iskart industriali preżenti fid-drenaġġ, jekk magħruf;
- iż-żmien u t-temperatura tat-test;
- fil-każ ta' kimika tat-test li ma tantx tinhall, it-trattament mogħti;
- il-metodu tat-test applikat; ir-raġinijiet xjentifiċi u l-ispejgazzjoni għandha tkun mogħtija għal xi tibdil tal-proċedura;
- il-folja tad-data;
- kwalunkwe fenomeni ta' l-inibizzjoni;
- xi degradazzjoni abjotika osservata;
- id-data speċifika kimika analitika, jekk disponibbli;
- id-data analitika dwar l-intermedjati, jekk disponibbli;
- il-grafika tad-degradazzjoni perċentwali kontra l-hin għat-test u s-sustanzi ta' referenza; il-fażi li ddewwem il-process, il-fażi tad-degradazzjoni, il-perijodu ta' 10 ijiem u l-linja għandha kjarament tkun indikata (l-Anness I). Jekk it-test ikun konformi mal-kriterja tal-validità, l-medja tal-perċentwali tad-degradazzjoni fil-grafini li jkun fihom is-sustanza tat-test tista tkun użata għall-grafika.
- perċentwal tat-tnehhija eata l-perijodu ta' 10 ijiem, u l-linja lixxa fil-quċċata jew fit-tmiem tat-test.

PARTI II. DOC TEST TAT-TNEHHIJA TAL-KULUR
(Metodu C.4-A)

II.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata li jkun fiha konċentrazzjonini magħrufa tas-sustanza tat-test 10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju organiku jkun mogħti l-arja fid-dlam jew fid-dawl baxx fi 22 ± 2 °C.

▼B

Id-degradazzjoni hija segwita bl-analizi DOC matul intervalli frekwenti matul perijodu ta' 28 jum. Il-grad tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat bl-espressjoni tal-koncentrazzjoni DOC imnehhija (ikkorreġuta għal dak fil-kontroll ta' l-inoculum fl-imbjank) bħala perċentwali tal-koncentrazzjoni inizjali preżenti. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista' wkoll ikun ikkalkolat mill-analizi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

II.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

11.2.1. **Apparat**

- (a) Garafini koniċi, eż. 250 ml sa 2 l, jiddependi mill-volum mehtieg għall-analizi DOC;
- (b) Magna taċ-ċekċik li tista takkomoda l-garafini koniċi, jew bil-kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata fit-temperatura kostanti tal-kamra, u forza suffiċjenti tal-potenza għaž-żamma tal-kondizzjonijiet etobiċi fil-garafini kollha;
- (ċ) Apparat tal-filtrazzjoni, b'membrani xierqa;
- (d) Analizzatur DOC;
- (e) Apparat għad-determinazzjoni ta' l-ossigenu mdewweb;
- (f) Ċentrifuga.

11.2.2. **Preparazzjoni tal-medja minerali**

Għall-preparazzjoni tat-tahlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Hawwad 10 ml tat-tahlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, žid 1 ml tat-tahlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

11.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jista' jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: hama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u hamrija jew minn tahlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

11.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, introduċi 800 ml porzjonijiet tal-medja minerali għewwa garafini koniċi 2 l u žid volumi suffiċjenti tat-tahlitiet bil-lest tat-test u tas-sustanzi ta' referenza mal-garafini separati sabiex takkwista konċentrazzjoni kemikali ekwivalenti għal 10-40 mg DOC/l. Ivverifika l-valuri pH u aġġusta, jekk mehtieg, għal 7.4. Inokula l-garafini b'hama' attivata jew b'sorsi oħrajn ta' l-inocula (ara I.6.4.), sabiex takkwista konċentrazzjoni mhux aktar minn 30 mg solidi sospizi fil-litru. Ipprepara wkoll il-kontrolli ta' l-inoculum fil-medja minerali imma mingħajr il-kimika tat-test jew ta' referenza.

Jekk mehtieg, uża reċipjent wiehed sabiex tivverifika l-possibbiltà ta' l-effett inibitorju tal-kimika tat-test bl-inokulazzjoni tat-tahlita li jkun fiha, fil-medja minerali, konċentrazzjonijiet komparabbli kemm tal-kimika tat-test u dik ta' referenza.

Ukoll, jekk mehtieg, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradata abjotikament bl-użu tat-tahlita mhux inokulata tal-kimika (ara I.6.6.).

▼B

B'mod addizzjonali, jekk ikun hemm suspett li l-kimika tat-test tkun sinifikament assorbita fuq il-ħġieġ, hama' eċċ., wettaq assessjar preliminari sabiex tkun determinata l-medda possibbli ta' l-assorbazzjoni u b'hekk l-adattabbiltà tat-test għall-kimika (ara t-Tabella 1). Organizza garafina li jkun fiha s-sustanza tat-test, l-inculum u l-aġent sterilizzanti.

Wassal il-volumi fil-garafini kollha għal 1:1 bil-medja minerali u, wara t-tahwib, hu kampjun minn kull garafina sabiex tiddetermina l-koncentrazzjonini inizjali ta' DOC (ara l-Anness II,4). Għatti l-ftuġ tal-garafini, eż. b'liega ta' l-aluminju, b'tali mod hekk li tippermetti l-iskambju hieles ta' l-arja bejn il-garafina u l-atmosfera tal-madwar. Imbagħad deffes ir-riċipjenti fil-magna taċ-ċekċik għall-bidu tat-test.

11.2.5. Numru ta' garafini fi prova tipika

Il-garafini 1 u 2: Sospensjoni tat-test,

Il-garafini 3 u 4: L-imbjank ta' l-inoculum,

Il-garafina 5: Proċedura tal-kontroll preferibbilment

u meta meħtieġ:

Il-garafina 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Il-garafina 7: Kontroll ta' l-adsorbazzjoni

Il-garafina 8: Kontroll tat-tossicità

Ara wkoll I.6.7.

II.2.6. It-twertieq tat-test

Matul it-test, iddetermina l-koncentrazzjonijiet ta' DOC f'kull garafina b'mod doppju f'intervalli tal-hin magħruf, ta' spiss b'mod suffiċjenti sabiex tkun tista tiddetermina l-bidu tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-persentaġġ tat-tnehhija fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem. Hu biss il-volum minimu tas-sospensjoni tat-test meħtieġ għal kull determinazzjoni.

Qabel il-kampjunar għamel tajjeb għat-telf ta' l-evaporazzjoni mill-garafini biż-żieda ta' ilma tat-trattib (I.6.1) fl-ammont meħtieġ, jekk ikun neċessarju. Hawwad il-medja tal-kultura sewwa qabel ma tiġbed il-kampjun u assigura li l-materjal li jehel mal-ġnub tar-riċipjenti jkun imdewweb jew sospiż qabel il-kampjunar. Immedjetament iffiltra mill-membrana jew b'ċentrifuga (ara l-Anness II.4) wara li jkun ingabar il-kampjun. Analizza l-kampjuni tal-filtrat jew taċ-ċentrifuga l-istess jum, altrimentri aħżen fi 2-4 °C għal massimu ta' 48 siegħa, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

II.3. DATA U RAPPORTAĠĠ**II.3.1. Trattament tar-riżultati**

Ikkalkola l-persentaġġ tad-degradazzjoni fil hin kif mogħti taht I.7.1. (determinazzjoni DOC) u, preferibbilment, taht I.7.2. (analizi speċifika).

Irreġistra r-riżultati kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

▼B**11.3.2. Validità tar-riżultati**

Ara I.5.2.

11.3.3. Rappurtaġġ

Ara I.8.

II.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST DOK TAT-TNEHHIJA TAL-KULU R

1. LABORATORJU**2. IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST****3. IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-tahlita bil-lest: mg/l bħala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, għal: mg/l bħala kimika

4. INOCULUM

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-tahlita tar-reazzjoni: mg/l

5. DETERMINAZZJONI TAL-KARBONJU

Analizzatur tal-karbonju:

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄
Kimika tat-test flimkien ma l-inoculum	1	a ₁					
		a ₂					
		a, medja C _{a(t)}					
	2	b ¹					
		b ²					
		b, medja C _{b(t)}					

▼ B

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n ₄
Inoculum fl-imbjank minghajr il-kimika tat-test	3	c ₁					
		c ₂					
		c, medja C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, medja C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. EVALWAZZJONI TAD-DATA MHIX ITTRATTATA

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
Medja (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D₁ u D₂ m'għandhiex tittiehed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. KONTROLLI ABJOTICI (voluntarji)

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. DOC (mg/l) f'kontroll sterili	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANALŻI TA' KIMIKA SPECIFIKA (voluntarja)

	ammont residwu tal- kimika tat-test fit-tmiem (mg/l)	% degradazzjoni primarja tat-test
Kontroll sterili	S _b	

▼B

	ammont residwu tal- kimika tat-test fit-tmiem (mg/l)	% degradazzjoni primarja tat-test
Medja tat-test inokulat	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTI III. TEST TA' L-GHAŻLA OECD MODIFIKATA
(Metodu °C.4-B)

III.1. PRINĊIPJU TAL-METODU

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata li jkun fiha konċentrazzjoni maghrufa tas-sustanza tat-test (10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju huwa inokulat b' 0,5 ml effluwent kull litru tal-medja. It-tahlita hija mogħtija l-arja fid-dlam jew f'dawl baxx hafna fi 22 ± 2 °C.

Id-degradazzjoni hija segwita bl-analiżi DOC matul intervalli frekwenti matul perijodu ta' 28 jum. Il-grad tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat bl-espressjoni tal-konċentrazzjonini DOC imnehhija (ikkorreġuta għal dak fil-kontroll ta' l-inoculum fl-imbjank) bħala perċentwali tal-konċentrazzjonini inizjali preżenti. Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista' wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni.

III.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

III.2.1. Apparat

- a) Garafini koniċi, eż. 250 ml sa 2 litri, jiddependi mill-volum meħtieġ għall-analiżi DOC;
- b) Magna taċ-ċekċik – li tista' takkomoda l-garafini koniċi, jew bil-kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata fit-temperatura kostanti tal-kamra, u forza suffiċjenti tal-potenza għaž-żamma tal-kondizzjonijiet etobiċi fil-garafini kollha;
- ċ) Apparat tal-filtrazzjoni, b'membrani xierqa;
- d) Analizzatur DOC;
- e) Apparat għad-determinazzjoni ta' l-ossigenu mdewweb;
- f) Ċentrifuga.

III.2.2. Preparazzjoni tal-medja minerali

Għall-preparazzjoni tat-tahlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Hawwad 10 ml tat-tahlita (a) ma 80 ml ilma tat-trattib, żid 1 ml tat-tahlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

Dan il-metodu jiżja biss 0,5 ml effluwent/litru bħala inoculum u għalhekk il-medja jista' jkun li tkun teħtieġ li tkun imsaħħa b'elementi traċċa u fatturi tat-tkabbir. Dan huwa magħmul biż-żieda ta' 1 ml kull wieħed mat-tahlitiet li ġejjin għal kull litru tal-medja finali:

▼B

Tahlita ta' l-element traċċa:

Tetraidrat tas-sulfat tal-magneżja, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Aċidu Boriku, H_3BO_3	57,2 mg
Hepaidrat tas-sulfat taż-żingu, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Ammonium heptamolybdate $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Fe-ċelat (FeCl_3 aċidu ethylenediamine-tetra-aċetiku)	100,0 mg
Dewweb fi, u wassal għal 1 000 ml bl-ilma tat-trattib	

Tahlita tal-vitamina:

Estratt tal-hmira	15,0 mg

Dewweb l-estratt tal-hmira fi 100 ml ilma. Sterlizza bil-passaġġ minn membrana 0,2 mikronji, jew għamilha friska.

III.2.3. **Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum**

L-inoculum jkun akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Ara I.6.4.2. u I.6.5.

0,5 ml kull litru tal-medja minerali hija użata.

III.2.4. **Preparazzjoni tal-garafini**

Bħala eżempju, introduċi 800 ml porzjonijiet tal-medja minerali għewwa garafini koniċi 2 l u żid volumi suffiċjenti tat-tahlitiet bil-lest tat-test u tas-sustanzi ta' referenza mal-garafini separati sabiex takkwista konċentrazzjoni kemikali ekwivalenti għal 10-40 mg DOC/l. Iverifika l-valur pH u aġġusta, jekk mehtieg, għal 7,4. Innokula l-garafini fl-effluwent tad-drenaġġ fi 0,5 ml/litru (ara I.6.4.2.). Ippreparata wkoll il-kontrolli ta' l-inoculum fil-medja minerali mingħajr il-kimika tat-test jew ta' referenza.

Jekk mehtieg, uża reċipjent wiehed sabiex tivverifika l-possibbiltà ta' l-effett inibitorju tal-kimika tat-test bl-inokulazzjoni tat-tahlita li jkun fiha, fil-medja minerali, konċentrazzjonijiet komparabbli kemm tal-kimika tat-test u dik ta' referenza.

Ukoll, jekk mehtieg, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradat abjotikament bl-użu tat-tahlita mhix inokulata tal-kimika (ara I.6.6.).

B'mod addizzjonali, jekk ikun hemm suspett li l-kimika tat-test tkun sinifikament adsorbita fuq il-ħġieg, hama' eċċ., wettaq assessjar preliminari sabiex tkun determinata l-medda possibbli ta' l-adsorbazzjoni u b'hekk l-adattabbiltà tat-test għall-kimika (ara t- Tabella 1). Organizza garafina li jkun fiha s-sustanza tat-test, l-inculum u l-aġent sterilizzanti.

Wassal il-volumi fil-garafini kollha għal 1:1 bil-medja minerali u, wara t-tahwib, hu kampjun minn kull garafina sabiex tiddetermina l-konċentrazzjonini inizjali ta' DOC (ara l-Anness II,4). Għatti l-ftuġ tal-garafini, eż. b'liega ta' l-aluminju, b'tali mod hekk li tippermetti l-iskambju hieles ta' l-arja bejn il-garafina u l-atmosfera tal-madwar. Imbagħad deffes ir-reċipjenti fil-magna taċ-ċekċik għall-bidu tat-test.

▼B**III.2.5. Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Il-garafini 5: Proċedura tal-kontroll

Preferibbilment u meta meħtieġ:

Il-garafini 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Il-garafini 7: Kontroll ta' l-adsorbazzjoni

Il-garafini 8: Kontroll tat-tossicità

Ara wkoll I.6.7.

III.2.6. It-tweġġ tat-test

Matul it-test, iddetermina l-konċentrazzjonijiet ta' DOC f'kull garafina b'mod doppju f'intervalli tal-hin magħruf, ta' spiss b'mod suffiċjenti sabiex tkun tista tiddetermina l-bidu tal-perijodu ta' 10 ijiem u l-persentaġġ tat-tnehhija fit-tmiem tal-perijodu ta' 10 ijiem. Hu biss il-volum minimu tas-sospenzjoni tat-test meħtieġ għal kull determinazzjoni.

Qabel il-kampjunar għamel tajjeb għat-telf ta' l-evaporazzjoni mill-garafini biż-żieda ta' ilma tat-trattib (I.6.1) fl-ammont meħtieġ, jekk ikun neċessarju. Hawwad il-medja tal-kultura sewwa qabel ma tiġbed il-kampjun u assigura li l-materjal li jehel mal-ġnub tar-recipient jkun imdewweb jew sospiż qabel il-kampjunar. Immedjatament iffiltra mill-membrana jew b'centrifuga (ara l-Anness II.4) wara li jkun ingabar il-kampjun. Analizza l-kampjuni tal-filtrat jew taċ-centrifuga l-istess jum, altrimentri aħżen fi 2-4 °C għal massimu ta' 48 siegħa, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

III.3. DATA URAPPORTAĠĠ**III.3.1. Trattament tar-riżultati**

Ikkalkola l-persentaġġ tad-degradazzjoni fil hin ta' kif mogħti taħt I.7.1. (determinazzjoni DOC) u, voluntarjament, taħt I.7.2. (analizi speċifika).

Irreġistra r-riżultati kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

III.3.2. Validità tar-riżultati

Ara I.5.2.

III.3.3. Rappurtaġġ

Ara I.8.

III.4. FOLJA TAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST MODIFIKAT TAL-GHAŻLA OECD

1. LABORATORJU**2. IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

▼B**3. IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-tahlita bil-lest: mg/litru bhala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, għal: mg/litru bhala kimika

4. INOCULUM

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospizi fit-tahlita tar-reazzjoni: mg/l

5. DETERMINAZZJONI TAL-KARBONJU

Analizzatur tal-karbonju:

	Garafina Nru		DOC wara jiem n (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Kimika tat-test flimkien ma l- inoculum	1	a ₁					
		a ₂					
		a, medja C _{a(t)}					
	2	b ¹					
		b ²					
		b, medja C _{b(t)}					
Inoculum fl- imbjank mingħajr il-kimika tat-test	3	c ₁					
		c ₂					
		c, medja C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, medja C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. EVALWAZZJONI TAD-DATAMHIX ITTRATTATA

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				

▼B

Garafina Nru		% degradazzjoni wara n jiem				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
Medja (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D₁ u D₂ m'għandhiex tittiehed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: formati simili jistghu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. KONTROLLI ABJOTICI (voluntarji)

	Żmien (jiem)	
	0	t
Konċ. DOC (mg/l) f'kontroll sterili	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANALIŻI TA' KIMIKA SPECIFIKA (voluntarja)

	Ammont residwu tal-kimika tat-test fit-tmien	% degradazzjoni primarja tat-test
Kontroll sterili	S _b	
Medja tat-test inokulat	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTI IV. TEST TA' L-EVOLUZZJONU CO₂ (METODU °C.4-C)**IV.1. PRINĊIPJU TAL-METODU**

Volum imkejjel tal-medja minerali innokulata li jkun fiha konċentrazzjoni magħrufa tas-sustanza tat-test 10-40 mg DOC/l) bħala l-unika sorsi nominali ta' karbonju organiku jkun mogħti l-arja fid-dlam jew fid-dawl baxx. Id-degradazzjoni hija segwita matul 28 jiem bid-determinazzjoni tad-diossidu tal-karbonju prodott, li huwa marbut fil-barju jew fl-idossidu tas-sodju u li huma mkejjel bit-titrazzjoni ta' l-idrossu residwu bħala karbonju mhux organiku. L-ammont tad-diossidu tal-karbonju prodott mit-test kimiku (ikkorreġut għal dak derivat mill-inoculum fl-imbjank (huwa espress bħala persentaġġ ta' ThCO₂). Il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista' wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmien ta' l-inkubazzjoni.

▼B**IV.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU****IV.2.1. Apparat**

- a) Garafini, 2-5 litri, kull wahda mghammra b'tubu ta' l-arjazzjoni li jwassal sa kważi il-qiegħ tar-reċipjent u bi hrug;
- b) Hawwada manjetiċi, għal meta jsir l-assessjar tal-kimika li ma tantx tinhall;
- c) Flixxien ta' assorbazzjoni tal-gass;
- d) Apparat għal kontroll u l-kejl tan-nixxija ta' l-arja;
- e) Apparat għat-tindig tad-diossidu tal-karbonju, għall-preparazzjoni ta' l-arja li hija hielsa mid-dossidu tal-karbonju; jew b'mod alternattiv, tahlita ta' CO₂ hieled mill-ossigenu u CO₂ hieles min-nitroġenu, minn ċilindri tal-gass fil-proporzjonijiet korretti (20 % O₂: 80 % N₂) jistgħu ikunu wżati;
- f) Apparat għad-determinazzjoni tad-diossidu tal-karbonju, jew b'mod titrimetrik u jew inkella f'xi għala ta' l-analizzatur tal-karbonju mhux-organiku;
- g) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);
- h) Analizzatur DOC (voluntarju).

IV.2.2. Preparazzjoni tal-medja minerali

Għall-preparazzjoni tat-tahlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Hawwad 10 ml tat-tahlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, žid 1 ml tat-tahlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

IV.2.3. Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum

L-inoculum jista' jkun akkwistat minn varjeta' ta' sorsi: hama' attivata, effluwenti tad-drenagg (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u hamrija jew minn tahlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

IV.2.4. Preparazzjoni tal-garafini

Bħala eżempju, il-volumi u l-piżijiet li ġejjin jindikaw il-valuri għal garafini ta' 5-litri li jkun fihom 3 litri ta' sospensjoni. Jekk volumi iżgħar ikunu wżati, immodifika l-valuri kif mehtieg, imma assigura li d-diossidu tal-karbonju iffurmat jista' jkun imkejjel bl-eżattezza.

Ma kull garafina ta' 5 litri žid 2 400 ml tal-medja minerali. Žid volum xieraq tal-hama' attivata ippreparata (ara I.6.4.1 u I.6.5.) sabiex takkwista koncentrazzjoni ta' solidi sospiżi ta' mhux aktar minn 30 mg/l fit-tahlita finali 3 l ta' l-inokulat. B'mod alternattiv, l-ewwel dewweb il-hama' ippreparata sabiex takkwista sospensjoni ta' 500-1 000 mg/l fil-medja minerali qabel ma žżid alikwott mal-kontenuti tal-garafina ta' 5-litri sabiex takkwista koncentrazzjoni ta' 30 mg/l; dan jassigura preċiżjoni akbar. Sorsi oħrajn ta' l-inoculum jistgħu ikunu wżati (ara I.6.4.2.).

Dahhal l-arja f'dawn it-tahlitiet tal- CO₂ hieles mill-arja matul il-lejl sabiex titnaddaf is-sistema mid-diossidu tal-karbonju.

▼B

Žid il-materjal tat-test u s-sustanza ta' referenza, separatament, bħala volum magħruf tat-tahlitiet lesti, f'garafini kopji sabiex takkwista l-koncentrazzjonijiet, kontribwiti biż-żieda tal-kimika, ta' 10 sa 20 mg DOC jew TOC/l; halli wħud mill-garafini mingħajr iż-żieda tal-kimika bħala kontrolli ta' l-inoculum. Žid sustanzi tat-test li jinhallu bilmod direttament fil-garafini u iżen jew ikkalkula il-baži tal-volum u opera kif deskritt fl-Anness III.

Jekk meħtieġ, uża garafina wahda sabiex tivverifika l-effett inibitorju possibbli tat-kimika tat-test biż-żieda kemm tal-kimika tat-test u tar-referenza fl-istess konċentrazzjonijiet kif preżenti fil-garafini l-oħrajn.

Ukoll, jekk meħtieġ, organizza garafina sterili oħra sabiex tivverifika jekk il-kimika tat-test tkun degradat abjotikament bl-użu tat-tahlita mhux inokulata tal-kimika (ara I.6.6.). Sterilizza biż-żieda ta' sustanza tossika fil-koncentrazzjoni xierqa.

Wassal il-volumi tas-sospenzi fil-garafina kollha għal 3 litri biż-żueda ta' medja minerali li preċedentament mogħtija l-arja bi CO₂ hieles mill-arja. B'mod operattiv, il-kampjuni jistgħu ikunu miġbura għall-analizi DOC (ara l-Anness II.4(u/jew analizi speċifika. Wahhal il-flixkien ta' l-assorbazzjoni mal-hruġ tal-garafini.

Jekk ikun użat l-idrossidu tal-barju, wahhal tlett flieken ta' l-assorbazzjoni, b'kull wiehed ikun fih 100 ml ta, 0,0125 M tahlita ta' l-idrossidu tal-barju, f'serje ta' garafini ta' 5-litri 'l wiehed. It-tahlita għandha tkun hielsa mis-sulfat u l-karbonat preċipitat u s-sahha tagħha għandhom ikunu determinati immedjatament qabel l-użu. Jekk ikun użat l-idrossidu tas-sodju, wahhal żewġ nasses, it-tieni taġixxi bħala kontroll għad-demostrazzjoni li d-diossidu tal-karbonju kollu kien assorbit fl-ewwel wiehed. Fliexken ta' l-assorbazzjoni mghammra b'għeluq tal-flixkun tas-serum huma adatti. Žid 200 ml 0,05 M idrossidu tas-sodju ma kull flixkun, li huwa suffiċjenti sabiex jassorbixxi l-kwantità totali tad-diossidu tal-karbonju evolut meta l-kimika tat-test tkun kompletament degradata. It-tahlita ta' l-idrossi tas-sodju, anki meta ippreparata friska, ikun fiha traċċi tal-karbonati, dan huma ikkorregut bit-tnaqqis tal-karbonat fl-imbjank.

IV.2.5. **Numru ta' garafini fi prova tipika**

Il-garafini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garafini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Garafina 5: Proċedura tal-kontroll u,

preferibbilment u meta meħtieġ:

Garafina 6: Kontroll ta' abjotiku sterili

Garafina 7: Kontroll tat-tossiċità

Garafina 8: Kontroll tat-tossiċità Ara wkoll I.6.7.

IV.2.6. **It-twerttieq tat-test**

Ibda t-test bit-tbaqbieq ta' CO₂ hieles mill-arja matul is-sospenzjoni bir-rata ta' 30-100 ml/min. Iġbor il-kampjuni ta' l-assorbent diossidu tal-karbonju perjodikament għall-analizi tal-kontenut CO₂. Matul l-ewwel għaxart ijiem huwa rakkomndat li l-analizi għandha tkun imwettqa fit-tieni jew fit-tielet jum u imbagħad kull hames jum sat-28 jum hekk li l-perijodu ta' l-10 ijiem jista jkun identifikat.

▼B

Fit-28 jum, igbor il-kampjuni (voluntarja) għall-analizi DOC u/jew speċifika, kejjel il-pH tas-sospensjoni u zid 1 ml ta' l-aċidu idrokloriku ikkonċentrat ma kull garafina; agħti l-arja lill-garafini matul il-lejn sabiex twarrab id-diossidu tal-karbonju preżenti fis-sospensjoni jiet tat-test. Fil-jum 29 aghmel l-aħhar analizi tad-diossidu tal-karbonju evolut.

Fil-jiem tal-kejl ta' CO₂, aqla l-assorbatur ta' l-idrossidu tal-barju l-ebreb lejn il-garafina, ittitra t-tahlita ta' l-idrossidu bi HCl 0,05 M bl-użu tal-fenilftalejn bhala indikatur. Mexxi l-assorbaturi li jkun fadat post aktar qrib tal-garafina u poġġi assorbatur ġdid li jkun fih 100 ml ta' l-idrossidu tal-barju frisk 0,0125 M fit-tarf imbiegħed tas-serje. Wettaq titrazzjonijiet kif meħtieġ, per eżempju, meta l-preċipitazzjoni sostanzjali hija murija fl-ewwel nassa u qabel ma jkun evidenti fit-tieni, jew mill-anqas darba fil-ġimgha. B'mod alternattiv, bi NaOH bhala assorbatur, igbed b'siringa kampjun żgħir (jiddependi mill-karatteristiċi ta' l-analizzatur tal-karbonju użat) tat-tahlita ta' l-idrossidu tas-sodju fl-assorbatur l-eqreb lejn il-garafina. Injetta direttament il-kampjun fil-parti IC ta' l-analizzatur tal-karbonju għall-analizi tad-diossidu tal-karbonju evolut.

Analizza l-kontenuti tat-tieni nassa biss fit-tmiem tat-test sabiex tikkorjeġi għal xi ammont żejjed tad-diossidu tal-karbonju.

IV.3. DATA U RAPPORTAĠĠ

IV.3.1. **Trattament tar-riżultati**

L-ammont ta' CO₂ fin-nassa ta' l-assorbatur meta ittrat huwa mogħti bi:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

meta:

V = il-volum ta' HCl użat għat-titrazzjoni tal-100 ml fl-assorbatur (ml).

C_B = il-konċentrazzjoni tat-tahlita ta' l-idrossidu tal-barju (M),

C_A = l-konċentrazzjoni tat-tahlita ta' l-aċidu idrokloriku (M),

jekk C_B jkun 0,0125 M u C_A huwa 0,05 M, it-titrazzjoni għal 100 ml idrossidu tal-barju hija 50 ml u l-piż ta' CO₂ huwa mogħti bi:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titrated} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Hekk, f'dan il-każ, sabiex il-volum ta' HCl titrat ikun ikkopnvertit għal mg tas-CO₂ prodott, il-fattur huwa 1,1.

Ikkalkola l-piżijiet ta' CO₂ prodott biss mill-inoculum u mill-iconulum flimkien mal-kimika tat-test bl-użu tal-valuri rispettivi tat-titrazzjoni u d-differenza fil-piż ta' CO₂ prodott biss mill-kimika tat-test.

Per eżempju, jekk l-inoculum biss jagħti titrazzjoni ta' 48 ml u l-inoculum flimkien mal-kimika tat-test jagħti 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ mill-inoculum} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

▼B

CO₂ mill-inoculum flimkien mal-kimika tat-test = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

u bhekk il-piż ta' CO₂ prodott mill-kimika tat-test hija 3,3 mg.

Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni huwa ikkalkolat minn:

$$\% \text{ degradazzjoni} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ prodott} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg kimika tat-test miżjuda}}$$

jew,

$$\% \text{ degradazzjoni} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ prodott} \times 100}{\text{mg TO miżjud mit-test} \times 3,67}$$

3,67 ikun il-fattur tal-konverżjoni (44/12) għall-karbonju tad-diossidu tal-karbonju.

Akkwista l-persentaġġ tad-degradazzjoni wara kwalunkwe intervall ta' hin biż-żieda tal-persentaġġ tal-valuri ThCO₂ ikkalkolat għal kull wahda mill-jiem, sa dak il-hin, li fih ikun imkejjel.

Għall-assorbaturi idrossidu tas-sodju, ikkalkola l-ammont tad-diossidu tal-karbonju prodott, espressa bħala IC (mg), bil-moltiplikazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' IC fl-assorbent bil-volum ta' l-assorbent.

Ikkalkula l-persentaġġ tad-degradazzjoni minn:

$$\% \text{ of ThCO}_2 = \frac{\text{mg IC garafina} - \text{mg IC imbjank}}{\text{MG TOC miżjud bħala kemikali għat-test}} \times 100$$

Ikkalkola DOC imneħħija (voluntarja) kif deskritt taħt 1.7. Irreġistra dawn u r-riżultati l-oħrajn kollha fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

IV.3.2. **Validità tar-riżultati**

Il-kontenut IC tas-sospensjoni tal-kimika tat-test fil-medja minerali fil-bidu tat-test għandu jkun anqas minn 5 % tal-TC, u t-total CO₂ ta' l-evoluzzjoni ta' l-inoculum fl-imbjank fit-tmiem tat-test għandu normalment jeċċedi 40 mg/l medja. Jekk valuri akbar minn 70 mg CO₂/litru jkunu akkwistati, id-data u t-teknika sperimentali għandha tkun eżaminata b'mod kritiku.

Ara wkoll I.5.2.

IV.3.3. **Rapportaġġ**

Ara I.8.

IV.4. **FOLJA TAD-DATA**

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST TA' L-EVOLUZZJONI TAD-DIOSSIDU TAL-KARBONJU

(1) **LABORATORJU**

(2) **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

(3) **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-tahlita bil-lest: mg/litru bħala kimika

▼B

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja: mg/litru bħala kimika

Total C miżjud mal-garaġina: mg C

ThCO₂: mg CO₂

4. INOCULUM

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-tahlita tar-reazzjoni:
mg/litru

Hin (jum)	CO ₂ iffurmat Test (mg)		CO ₂ iffurmat imbjank (mg)		CO ₂ iffurmat Kumulattiv (mg) (Il-medja ta' l-imbjank minus tat-test)		ThCO ₂ Kumulattiv $\frac{\text{CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	1 2	medja	3 4	medja	1	2	1	2	medja
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Nota: formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità

6. ANALIŻI TAL-KARBONJU (voluntarju)

Analizzatur tal-karbonju:

Żmien (jiem)	Imbjank mg/l	Kimika tat-test mg/l
0	C _{b(o)}	C _o
28 (*)	C _{b(t)}	C _t

(*) jew fl-ahħar ta' l-inkubazzjoni.

▼B

$$\% \text{ DOC imnehi} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_o - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. DEGRADAZZJONI ABJOTIKA (voluntarja)

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{\text{CO}_2 \text{ il - formazzjoni f'garafina sterlili wara 28 jum (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

PARTI V. TEST TAR-RESPIROMETRIJA MANJOMETRIKA (Metodu C.4-D)**V.1. PRINĊIPJU TAL-METODU**

Volum imkejjel tal-medja minerali inokulata, li jkun fiha konċentrazzjoni maghrufa tal-kimika tat-test (100 mg/litru tas-sustanza tat-test, li taghti mill-anqas 50-100 mg ThOD/litru) bhala s-sorsi unika nominali tal-karbonju organiku, hija mhawwda f'garafina magħluqa f'temperatura kostanti (± 1 °C jew eqreb) għal sa 28 jum. Il-konsum ta' l-ossigenu huwa determinat jew bil-kejl tal-kwanità ta' ossigenu (prodott b'mod elettrolitiku) mehtieg għaž-żamma tal-volum tal-gass fil-garafina respirometru, jew bit-tibdil fil-volum jew fil-pressure (jew għemgħa tat-tnejn) fl-apparat. Id-diossidu tal-karbonju evolu huwa assorbit fit-tahlita ta' l-idrossidu tal-putassa jew f'xi assorbent xieraq iehor. L-ammont ta' ossigenu akkwistat bil-kimika tat-test (ikkorreġut għall-akwista mill-inoculum fl-imbjank, imwettaq b'mod parallel) huwa espress bhala persentaġġ ta' ThOD jew COD. B'mod voluntarju, il-grad tal-biodegradazzjoni primarja jista wkoll ikun ikkalkolat mill-analiżi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, u fl-aħħar mill-aħħar il-biodegradazzjoni bl-analiżi DOC..

V.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU**V.2.1. Apparat**

- a) respirometru xieraq;
- b) kontroll tat-temperatura, żamma ta' ± 1 °C jew ahjar;
- c) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);
- d) analizzatur tal-karbonju (voluntarju).

V.2.2. Preparazzjoni tal-medja minerali

Għall-preparazzjoni tat-tahlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Hawwad 10 ml tat-tahlita (a) ma 800 ml ilma tat-trattib, zid 1 ml tat-tahlitiet (b) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-trattib.

V.2.3. Preparazzjoni u pre-kondizzjonar ta' l-inoculum

L-inoculum jista jkun akkwistat minn varjeta ta' sorsi: hama' attivata, effluwenti tad-drenaġġ (mhux klorinati), ilmijiet minn wiċċ l-art u hamrija jew minn tahlita ta' dawn.

Ara I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. u I.6.5.

V.2.4. Preparazzjoni tal-garafini

Ipprepara t-tahlitiet għat-test u l-kimika tar-referenza, flottijiet separati, f'medja minerali ekwivalenti għal konċentrazzjoni, normalment, ta' 100 mg kimika/litru (li taghti mill-anqas 50-100 mg ThOD/litru), bl-użu tat-tahlitiet bil-lest.

▼B

Ikkalkola il-ThOD fuq il-baži tal-formazzjoni ta' l-imluħa ta' l-ammonium, sakemm nitrifikazzjoni tkun antiċipata, meta l-kalkolazzjoni għandha tkun ibbażata fuq il-formazzjoni nitrika (ara l-Anness II.2.)

Iddetermina l-valuri pH u aġġusta, jekk meħtieġ, għal 7.4 ± 0.2 .

Sustanzi li ma tantx jinhallu għandhom ikunu miżjuda fi stadju aktar tard (ara hawn taht).

Jekk it-tossiċità tal-kimika tat-test għandha tkun determinata, ipprepara tahlita oħra fil-medja minerali li jkun fiha kemm il-kimika tat-test u tar-referenza fl-istess konċentrazzjonijiet bħal fit-tahlitiet individwali.

Jekk il-kejl tat-tehid fiżiku-kimiku ta' l-ossigenu huwa meħtieġ, ipprepara tahlita tal-kimika tat-test fi, mormalment, 100 mh ThOD/-litru li tkun ġiet sterilizzata biż-żieda ta' sustanza tassika adatta (ara I.6.6.).

Introduċi l-volum meħtieġ tat-tahlitiet tal-kimika tat-test u ta' referenza, rispettivament, mill-anqas fil-garaġfini duplikati. Żid ma garaġfini oħrajn il-medja minerali biss (għal kontrolli ta' l-inoculum) u, jekk meħtieġ, it-tahlita tal-kimika tat-test imhallta/ta' referenza, u t-tahlita sterili.

Jekk il-kimika tat-test ma tantx tkun tinhall, żid sustanzi tat-test li jinhallu bil-mod direttament fil-garaġfini u ižen jew ikkalkula l-baži tal-volum u opera kif deskritt fl-Anness III. Żid l-idrossidu tal-putazza, gerbubi tal-ġir tas-soda jew assorbent iehor mal-kompartimenti assorbatur CO₂.

V.2.5. **Numru ta' garaġfini fi prova tipika**

Il-garaġfini 1 u 2: Sospenzjoni tat-test

Il-garaġfini 3 u 4: Inoculumi fl-imbjank

Il-garaġfini 5: Proċedura tal-kontroll preferibbilment, u meta meħtieġ:

Il-garaġfini 6: Kontroll sterili

Il-garaġfini 7: Kontroll tat-tossiċità

Il-garaġfini 8: Kontroll tat-tossiċità

Ara wkoll I.6.7.

V.2.6. **It-twerttieg tat-test**

Halli l-garaġfini jilhqu t-temperatura mixtieqa u inokula r-reċipjenti xierqa bil-hama' attivata ippreparata jew b'sors iehor ta' l-inoculum sabiex takkwista konċentrazzjoni ta' solidi sospizi ta' mhux aktar minn 30 mg/litru. Hejji l-apparat, qabbad il-hawwadi u iivverifika li ma tghaddix arja, u ibda bil-kejl tat-tehid ta' l-ossigenu. Normalment l-ebda attenzjoni oħra m'hija meħtieġa apparti milli t-tehid tal-qari u tal-virifika odjerna sabiex tara li t-temperatura korretta u t-tahwis adegwat ikun mantenut.

Ikkalkola t-tehid ta' l-ossigenu mill-qari meħuda f'intervalli regolati u ta' spiss, bl-użu tal-motodi rakkomandati mill-manifattur ta' l-apparat. Fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, normalment 28 jum, kejjel il-pH tal-kontenuti tal-garaġfini, speċjalment jekk it-tehid ta' l-ossigenu jkun baxx jew aktar minn ThODNH₄ (għal komposti li jkun fihom in-nitroġenu).

▼B

Jekk mehtieg, nehli l-kampjuni mill-garafini respiometri, inizjalment u finalment, għall-analiżi ta' DOC jew kimika speċifika (ara l-Anness II.4). Fit-tnehhija inizjali, assigura li l-volum tas-sospensjoni tat-test li jkun baqa' fil-garafina, jkun magħruf. Meta l-ossigenu jkun meħud mis-sustanza tat-test li jkun fiha l-N, iddetermina ż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat u wettaq in-nitrazzjoni matul 28 jum u ikkalkola l-korrezzjoni għall-ossigenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni (l-Anness V).

V.3. DATA U RAPPORTAĠĠ**V.3.1. Trattament tar-riżultati**

Iddividi l-akkwista ta' l-ossigenu (mg) tal-kimika tat-test wara hin pre-determina (korreġut għal dak ta' l-inoculum tal-kontroll fl-imbjank wara l-istess hin) bil-piż tat-kimika tat-test kif użata. Dan iforni il-BOD espress bħala mg ossigenu/mg kimika tat-test, igiefiri

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{test} - \text{mg O}_2 \text{ teħid bl-})}{(\text{mg kimika tat} - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

mg O₂ kull mg kimika tat-test

ikkalkola l-persentaġġ tal-biodegradazzjoni jew minn:

$$\% \text{ bijodegradazzjoni} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg kemikali})}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2 \text{ kemikali})} \times 100$$

Jew inkella minn:

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg kemikali})}{\text{COD}(\text{mg O}_2 \text{ kemikali})} \times 100$$

Għandu jkun innotat li dawn iż-żewġ metodi mhux neċessarjament jagħtu l-istess valur, huwa preferibbli li jsir użu mill-metodu preċedenti.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom in-nitroġenu, għamel użu mill-ThOD xieraq (NH₄ jew NO₃) skond ma jkun magħruf jew mistenni dwar l-okkorrenza tan-nitrifikazzjoni (l-Anness II.2). Jekk in-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkun kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossigenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

Meta determinazzjonijiet voluntarji tal-karbonju organiku u/jew ta' kimika speċifika jkun saru, ikkalkola il-persentaġġ tad-degradazzjoni, kif deskritt taht I.7.

Irreġistra r-riżultati kollha dwara id-data fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

V.3.2. Validità tar-riżultati

It-teħid ta' l-ossigenu ta' l-inoculum fl-imbjank normalment huwa 20-30 mg O₂/litru u m'għandux ikun aktar minn 60 mg/litru fi 28 jum. Valuri għola minn 60 mg/litru jkunu jehtieġu eżaminazzjoni kritika tad-data u tat-tekniki sperimentali. Jekk il-valur tal-pH huwa l-barra mill-medda 6-8, 5 u l-konsum ta' l-ossigenu bil-kimika tat-test huwa anqas minn 60 %, it-test għandu jkun repetut b'konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test.

Ara wkoll I.5.2.

Ara I.8.

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST RESPIRATORJU MANOMETRIKU

1. LABORATORJU

2. IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST

3. IS-SUSTANZA TAT-TEST

Isem:

Il-koncentrazzjoni tat-taħlita bil-lest: mg/litru

Koncentrazzjoni inizjali fil-medja, C_0 : mg/litru

Volum fil-garaġina tat-test (V): ml

ThOD jew COD: mg O₂/mg sustanza tat-test (NH₄, NO₃)

4. INOCULUM

Sorsi:

Trattament mogħti:

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi fit-tahlita tar-reazzjoni: mg/l

5. TEHID TA' L-OSSIĠENU BIODEGRADABBILTÀ

[illegible]

▼B

		Jum											
		0		7		14			21			28	
% degradazzjoni $\frac{\text{BOD}}{\text{ThOD}} \times 100$	D ₁ (a ₁)												
	D ₂ (a ₂)												
	Medja (*)												

V = Volum tal-medja fil-garafina tat-test

(*) D₁ u D₂ m'għandhiex tittiehed il-medja tagħhom jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

N.B.: Formati simili jistghu ikunu wżati għall-kimika tar-referenza u l-kontrolli tat-tossicità.

6. KORREZZJONI GĦAN-NITRIFIKAZZJONI (ara l-Anness V)

Jum	0	28	Differenza
(i) Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)			(N)
(ii) Ossigenu ekwivalenti ($4,57 \times N \times V$) (mg)	—	—	
(iii) Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)			(N)
(iv) Ossigenu ekwivalenti ($3,43 \times N \times V$) (mg)	—	—	
(ii + iv) Ossigenu ekwivalenti totali	—	—	

7. ANALIŻI TAL-KARBONJU (volontarju)

Analizzatur tal-karbonju:

Žmien (jiem)	mg/litru fl-imbjank	Kimika tat-test mg/litru
0	(C _{blo})	(C _o)
28 (*)	(C _{blt})	(C _t)

(*) jew fl-aħħar ta' l-inkubazzjoni.

$$\% \text{ DOC imneħhi} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. KIMIKA SPECIFIKA (volontarja)

S_b = konċentrazzjoni fil-fiziko0kimika (sterili) mal-kontroll ta' 28 jum

S_a = konċentrazzjoni fil-garafina inokulta fi 28 jum.

$$\% \text{ biodegradazzjoni} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. DEGRADAZZJONI ABJOTIKA (volontarja)

a = konsum ta' l-ossigenu f'garafini sterili wara 28 jum, (mg)

$$\text{konsum ta' l-ossigenu għall kull mg tal-kimika tat-test} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(ara s-sezzjonijiet 1 u 3)

$$\% \text{ degradazzjoni abjotika} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times \text{ThOD}}$$

PARTI VI. TEST TAL-FLIXKUN MAGHLUQ (Metodu °C.4-E)

VI.1. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-tahlita tal-kimika tat-test f'medja minerali, normalment fi 2-5 mg/litru, hija inokulata b'relattivament numru żgħir ta' mikro-organizmi minn popolazzjoni mħallta u miżmuma fi fliexken, kompletament mimlija u magħluqa, fid-dlam u f'temperatura kostanti. Id-degradazzjoni hija segwita bl-analizi ta' l-ossigenu maħlul matul perijodu ta' 28 jum. L-ammont ta' ossigenu akkwistat bil-kimika tat-test, ikkorreġut għall-akwista mill-inoculum fl-imbjank, imwettaq b'mod parallel, huwa espress bħala persentaġġ ta' ThOD jew COD.

VI.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

VI.2.1. Apparat

- a) Fliexken BOD, b'tappini tal-ħġieġ, eż. 250-300 ml;
- b) Banju ta' l-ilma jew inkubatur, għaż-żamma tal-fliexken f'temperatura kostanti (± 1 °C jew aħjar) bl-esklużjoni tad-dawl;
- ċ) Fliexken tal-ħġieġ kbar (2-5 litri) għall-preparazzjoni tal-medja u għall- mili tal-fliexken BOD;
- d) Elettrodu u arloġġ ta' l-ossigenu, jew apparat u reaġenti għat-titrazzjoni Winker.

VI.2.2. Preparazzjoni tal-medja minerali

Għall-preparazzjoni tat-tahlitiet bil-lest, ara I.6.2.

Hawwad 1 (wieħed) tat-tahlita (a) sa (d) u wassal sa litru bl-ilma tat-taħwid.

VI.2.3. Preparazzjoni ta' l-inoculum

L-inoculum huwa normalment akkwistat minn effluwent sekondarju ta' l-impjant tat-trattament jew minn unità tal-iskala tal-laboratorju li jirċievi b'mod predominanti d-drenaġġ domestiku. Sors alternattiv ieħor għall-inoculum hija l-ilma tal-wiċċ ta' l-art. Normalment l-użu huwa ta' taqtira wahda (0,05 ml) ma 5 ml tal-filtrat għal kull litru tal-medja; il-provi jistgħu jehtieġ li jiskopru l-aħjar volum għal effluwent partikolari (ara I.6.4.2. u I.6.5.).

VI.2.4. Preparazzjoni tal-garafini

B'mod qawwi dahhal l-arja f'medja minerali għal mill-anqas 20 minuta. Wettagħ kull wahda mis-serje tat-testijiet bil-medja akkwistata mill-istess lott. Generalment, il-medja hija lesta għall-użu wara li tkun qagħdet għal 20 siegħa, fit-temperatura tat-test. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' l-ossigenu mdewweb għall-iskopijiet tal-kontroll; il-valur għandu jkun madwar 0 mg/litru fi 20 °C. Wettagħ l-operazzjonijiet kollha tat-trasferiment u tal-mili tal-medja saturata bl-arja imma mingħajr bżiejaq, per eżempju, bl-użu ta' sifuni.

▼B

Ipprepara grupp paralleli ta' fliexken BOD għad-determinazzjoni tat-test u l-kimika ta' referenza f'serje sperimentali simultanji. Organizza numru suffiċjenti tal-fliexken BOD, inklużi l-inoculum fl-imbjank, sabiex tippermetti mill-anqas kejl duplikat tal-konsum ta' l-ossigenu li jsir matul l-intervalli mixtieqa tat-test, per eżempju, wara 0, 7, 14, 21 u 28 jum. Sabiex tassigura li tkun tista tidentifika l-perijodu ta' l-10 ijiem, aktar fliexken jistgħu ikunu mehtieqa.

Żid medja minerali mimlija kollha bl-arja ma fliexken kbar hekk li jkunu mimlija għal madwar terz. Imbagħad iżid tahlitiet bil-lest suffiċjenti tal-kimika tat-test u tal-kimika ta' referenza sabiex tissepara l-fliexken il-kbar hekk l-koncentrazzjoni finali tal-kimika tkun normalment mhux akbar minn 10 mg/litru. M'għandek iżżid l-ebda kimika ma l-imbjank fil-medja tal-kontroll li tkun fi fliexkun kbir ieħor.

Sabiex tassigura li l-attività ta' l-inoculum ma tkunx limitata, il-koncentrazzjoni ta' l-ossigenu mdewweb m'għandhiex tinżel aktar baxxa minn 0,5 mg/litru fil-fliexken BOD. Dawn jillimitaw il-koncentrazzjoni tal-kimika tat-test għal madwar 2 mg/litru. B'dana kollu, għal komposti b'degradabbiltà baxxa u dawk bi ThOD baxxa, 5-10 mg/litru jistgħu ikunu wżati. F'uħud mill-każi, ikun rakommandabbli li twettaq b'mod parallel serje tal-kimika tat-test f'żewġ koncentrazzjonijiet differenti, per eżempju, 2 u 5 mg/litru. Normalment, għandek twettaq il-kalkolu tal-ThOD fuq il-bażi tal-formazzjoni tal-melħ ta' l-ammonium, imma, jekk in-nitrifikazzjoni tkun mistennija jew ikun magħruf li sseħħ, aghmel il-kalkolu fuq il-bażi tal-formazzjoni tan-nitrat (ThOD_{NO3}: ara l-Anness II.2). B'danakollu, jekk in-nitrifikazzjoni ma tkunx kompluta imma isseħħ, għamel korrezzjoni għat-tidil fil-koncentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat, determinati fl-analiżi, (ara l-Anness V).

Jekk it-tossicità tal-kimika tat-test għandha tkun investigata (fil-każ, per eżempju, tal-valur preċedenti baxx tal-biodegradabbiltà li jkun ġie misjub), serje oħra ta' fliexken hija neċessarja.

Ipprepara fliexkun kbir ieħor li jkun fih medja minerali bl-arja (sa madwar terz tal-volum tiegħu) flimkien mal-kimika tat-test u l-kimika ta' referenza fil-koncentrazzjoni finali normalment l-istess bħal dawk fil-fliexken kbar l-oħrajn.

Inokula t-tahlitiet fil-fliexken il-kbar b'effluent sekondarju (qatra waħda jew madwar 0,05 ml, ma 5 ml/litru) jew b'sorsi oħra bħal ma hu l-ilma tax-xmara (ara I.6.4.2.). Finalment, wassal it-tahlitiet għall-volum b'medja minerali bl-arja bl-użu ta' manka li tilhaq sal-qiegħ tal-fliexkun sabiex takkwista tahlita adekwata.

VI.2.5. Numru ta' garafini fi prova tipika

Fi prova tipika, il-fliexken li ġejjin huma wżati:

- mill-anqas 10 li jkun fihom il-kimika tat-test u ta' l-inoculum (sospensjoni tat-test),
- mill-anqas 10 li jkun fihom biss l-inoculum (inoculum fl-imbjank),
- mill-anqas 10 li jkun fihom il-kimika ta' referenza u ta' l-inoculum (kontroll tal-proċedura),

▼B

- u, meta mehtieg, 6 fliexken li jkun fihom il-kimika tat-test, kimika ta' referenza u l-inoculum (kontroll tat-tossicità). B'dana kollu, sabiex tassigura li tkun tista tidentifika l-perijodu ta' l-10 ijiem, madwar id-doppju ta' fliexken jistghu ikunu mehtiega.

VI.2.6. It-twertieq tat-test

Forni kull tahlita ippreparata immedjetament ġewwa kull grupp rispettiv tal-fliexken BOD bil-manka mill-kwart tl-isfel (mhux mill-qiegħ) tal-flixxun kbir xieraq, hekk li l-fliexken BOD kollha jkunu kompletament mimlija. Taptap bil-ġentilizza sabiex tneħhi xi bżieġaq ta' l-arja. Analizza il-fliexken hin-zero immedjetament għall-ossigenu mdewweb bil-metodi Winkles jew bl-elettrodi. Il-kontenuti tal-fliexken jistghu jkunu preservati għal analizi aktar tard bil-metodu Winkles biż-żieda tal-manganiż (II) sulfat jew idrossidu tas-sodju (l-ewwel reagent Winkler). Ahżen bil-galbu l-fliexken magħluqa bl-istoppni, li jkun fihom l-ossigenu iffissat bħala manganiż kannella (III) ossidu idrat, fid-dlam fi 10-20 °C għal mhux aktar minn 24 siegħa qabel ma tipproċedi bil-kumplement tal-passi tal-metodu Winkler. Aghmel it-tappini fuq il-kumplement tal-flixxien, tassigura li l-eċċa bżieġaq ta' l-arja ma jkunu magħluqa, u inkuba fi 20 °C fid-dlam. Kull serja għandha tkun akkumpanjata b'serje parallela shiha għad-determinazzjoni tal-medja in-bjank inokulata. Neħhi mill-anqas il-flixxien duplikati tas-serje kollha għall-abalizi ta' l-ossigenu mdewweb matul l-intervalli tal-hin (mill-anqas kull ġimgħa) matul it-28 jum ta' l-inkubazzjoni.

Kampjuni ta' kull ġimgħa għandhom jippermettu l-assessjar tat-tneħhi percentwali fil-perijodu ta' 14-il jum, fil-waqt li l-kompjuner ta' kull 3-4 ijiem għandu jippermetti li l-perijodu ta' 10 ijiem li jkun identifikat, li jkun jehtieg madwar id-doppju ta' tant fliexken.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom N, korrezzjonijiet għat-teħid ta' l-ossigenu minn xi nitrifikazzjoni li sseħh, għandu jsir. Sabiex isir dan, uża l-metodu ta' l-elettrodi-O₂ għad-determinazzjoni tal-koncentrazzjoni ta' l-ossigenu mdewweb u imbagħad warrab il-kampjun mill-flixxun BOD għall-analizi tan-nitrit u n-nitrat. Miż-żieda fil-koncentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat, wettaq il-kalkolu ta' l-ossigenu użat (ara l-Anness V).

VI.3. DATA U RAPPORTAĠĠ**VI.3.1. Trattament tar-riżultati**

L-ewwel aghmel il-kalkolu tal-BOD eżerċitat wara kull perijodu ta' żmien billi tnaqqas l-eżawriment ta' l-ossigenu (mg O₂/litru) ta' l-inoculum fl-imbjank minn dak esibit bit-test kimiku. Iddividi dan l-eżawriment ikkorreġut bil-koncentrazzjoni (mg/litru) tal-kimika tat-test, sabiex takkwista l-BOD speċifika vġama mg ossigenu kull mg tal-kimika tat-test. Wettaq il-kalkolu tal-persentaġġ tal-biodegradabbiltà billi tiddividi l-BOD speċifika bil-ThOD speċifika (ikkalkolata skond l-Anness II,2) jew il-COD (determinata bl-analizi, ara l-Anness II,3), b'hekk:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ teħid bil} - \text{kimika tat} - \text{test} - \text{mg O}_2 \text{ teħid bl} - \text{imbjank})}{(\text{mg kimika tat} - \text{test fil} - \text{garafina})}$$

▼B

mg O₂ kull mg tal-kimika tat-test

$$\% \text{ biodegradazzjoni} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg kemikali għat - test)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg kemikali għat - test)}} \times 100$$

jew

$$\% \text{ degradation} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg kemikali għat - test)}}{\text{COD (mg O}_2\text{/mg kemikali għat - test)}} \times 100$$

Għandu jkun innotat li dawn iż-żewġ metodi mhux neċessarjament jagħtu l-istess valur, huwa preferibbli li jsir użu mill-metodu preċedenti.

Għal sustanzi tat-test li jkun fihom in-nitroġenu, għamel użu mill-ThOD xieraq (NH₄ jew NO₃) skom ma jkun magħruf jew mistenni dwar l-okkorrenza tan-nitrifikazzjoni (l-Anness II.2). Jekk in-nitrifikazzjoni isseħħ imma ma tkun kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossigenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

VI.3.2. **Validità tar-riżultati**

L-eżawriment ta' l-ossigenu mill-imbjank ta' l-inoculum m'għandux jeċċedi 1,5 mg ossigenu mdewwb/litru wara 28 jum. Valuri għola minn dan jeħtieġu investigazzjoni tat-tekniki sperimentali. Il-konċentrazzjoni residwa ta' l-ossigenu fil-fliexken tat-test m'għandhiex tinżel għal anqas minn 0,5 mg/litru fi kwalunkwe żmien. Livelli hekk baxxi ta' l-ossigenu huma validi biss jekk il-metodu għad-determinazzjoni ta; l-ossigenu mdewweb tkun tista tkejjel tali livella bl-akbar eżattezza.

Ara wkoll I.5.2.

VI.3.3. **Rapportagġ**

Ara I.8.

VI.4. **FOLJA TAD-DATA**

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti aktar il-quddiem.

TEST TAL-FLIXKUN MAGHLUQ

1. **LABORATORJU**

2. **IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST**

3. **IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-tahlita bil-lest: mg/litru

Konċentrazzjoni inizjali fil-fliexkun: mg/litru

ThOD jew COD: mg O₂/mg sustanza tat-test

4. **INOCULUM**

Sorsi:

Trattament mogħti:

▼B

Pre-kondizzjonar, jekk ikun hemm:

Konċentrazzjoni fit-tahlita tar-reazzjoni: mg/litru

5. DETERMINAZZJONI DO

Metodu: Winkler/elettrodu

L-analiżi tal-garaġini

Iż-żmien ta' l-inkubazzjoni (d)				DO (mg/l)			
				0	n ₁	n ₂	
Imbjank kimika)	(mingħajr	1	C ₁				
		2	C ₂				
Medja		$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Kimika tat-test		1	a ₁				
		2	a ₂				
Medja		$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Nota: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kompost tar-referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

6. KORREZZJONI GHAN-NITRIFIKAZZJONI (ara l-Anness V)

Iż-żmien ta' l-inkubazzjoni (d)	0	n ₁	n ₂	n ₃
(i) Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)				
(ii) Tibdil tal-konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)	—			
(iii) Ossigenu ekwivalenti (mg/litru)	—			
(iv) Konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)				
(v) Tibdil tal-konċentrazzjoni tan-nitrat (mg N/litru)	—			
(vi) Ossigenu ekwivalenti (mg/litru)	—			
(iii + vi) Ossigenu totali ekwivalenti (mg/litru)	—			

7. EŻAWRIMENT DO: % DEGRADAZZJONI

	Degradazzjoni wara jiem n (mg/litru)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
GARAFINA 1: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
GARAFINA 2: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				

▼B

	Degradazzjoni wara jiem n (mg/litru)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
GARAFINA 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{konk tat} - \text{test ThOD kemikali}}$				
GARAFINA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100}{\text{konk tat} - \text{test ThOD kemikaliof test} \times \text{ThOD chemical}}$				
$\% D \text{ medja (*)} = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) bhala kondizzjoni stabbli (medja)

m_{t0} = alur fil-garafina tat-test fil-hin 0

m_{tx} = alur fil-garafina tat-test fil-hin x

m_{b0} = l-valur medju ta' imbjank fil-hin 0

m_{bx} = il-valur medju ta' imbjank fil-hin x

Applika wkoll il-korrezzjoni ghan-nitrifikazzjoni minn iii+vi fis-sezzjoni 6.

8. EŻAWRIMENT DO IMBJANK

Konsum ta' l-ossigenu fl-imbjank: ($m_{b0} - m_{b28}$) mg/litru Dan il-konsum huwa importanti għall-validità tat-test. Dan għandu jkun anqas minn 1,5 mg/litru.

PARTI VII. TEST M.I.T.I. (Metodu °C.4-F)

VII.1. PRINĊIPJUTAL-METODU

It-tehid ta' l-ossigenu bit-tahlita mhawda, jew bis-sospensjoni, tal-kimika tat-test f' medja minerali, inokulata b' mikro-organizmi speċjalment imkabbra, mhux adattati, hija mkejla awtomatikament matul perijodu ta' 28 jum f' respirometri magħluq u fid-dlam fi 25 ± 1 °C. Id-disossidu tal-karbonju evolut huwa assorbit bil-ġir tas-soda. Il-biodegradabbiltà hija espressa bhala persentaġġ tat-tehid ta' l-ossigenu (ikkorreġut għat-tehid fl-imbjank) tat-tehid teoretiku (ThOD). Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni primarja jista' wkoll ikun ikkalkolat mill-analizi kimika supplemetari mwettqa fil-bidu u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, u fl-aħħar mill-aħħar il-biodegradazzjoni bl-analizi DOC.

VII.2. DESKRIZZJONI TAL-METODU

VII.2.1. **Apparat**

- Arloġġ BOD elettroliku awtomatiku jew respirometru normalment mghammar b'6 fliexken, 300 ml il-wiehed, u mghammar b'kikkri sabiex ikun fihom l-assorbent CO₂;

▼B

b) Kamra ta' temperatura kostanti u/jew banju ta' l-ilma fi $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ jew ahjar;

c) Apparat tal-filtrazzjoni bil-membrana (voluntarju);

d) analizzatur tal-karbonju (voluntarju).

VII.2.2. Preparazzjoni tal-medja minerali

Ipprepara t-tahlitiet bil-lest li ġejjin, bl-użu ta' reagenti ta' grad analitiku u l-ilma (I.6.1.):

a)	Monopotassium dihydrogen ortho phosphate, KH_2PO_4	8,50 g
	Dipotassium monohydrogen ortho phosphate, K_2HPO_4	21,75 g
	Disodium monohydrogen ortho phosphate dodecahydrate $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$	44,60 g
	Klorid ta' l-ammonium, NH_4Cl	1,70 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	
	Il-valur pH tat-tahlita għandu jkun 7,2	
b)	Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$	22,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru	
c)	Klorid tal-kalċji, anidriju, CaCl_2	27,50 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	
d)	Hadid (III) eksaidrat tal-klorid, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$	0,25 g
	Dewweb fl-ilma u wassal għal-litru.	

Hu 3 ml ta' kull tahlita (a), (b), (c) u (d) u wassal sa litru.

VII.2.3. Preparazzjoni ta' l-inoculum

Igħor kampjuni friski minn mhux anqas minn għaxar siti, l-aktar minn zoni ta' fejn varjetà ta' kimiċi huma użati u mormija. Minn siti bħalma huma l-impjanti tat-trattament tad-drenaġġ, trattament ta' l-iskart industrijali, xmajjar, għadajjer, ibhra, igħor litru tal-kampjun u tal-hama', hamrija tal-wieċ, ilma, eċċ., u hallat sewwa flimien. Wara li tneħhi l-materja li jkun hemm fil-wieċ u thalli li joqgħod, aġġusta s-supernatant għal pH 7 ± 1 bl-idrossidu tas-sodju u l-aċidu fosforiku.

Uża l-volum xieraq mas-supernatant iffiltrat sabiex timla reċipjent tal-“mili u ġbir” tal-hama' attivata u aghthi l-arja lil-likwidu għal madwar 23 l/2 siegħat. Tletin minuta wara li tkun waqfet l-arjazzjoni, warrab madwar terz tal-volum kollu tas-supernatant u zid volum egwali tat-tahlita (pH 7) li jkun fiha 0,1 % kull wiehied tal-glukożju, peptun, u monopotassa orto fosfat, mal-materja li tkun qagħdet u erga ibda bl-arjazzjoni. Irrepeti din il-proċedura darba kuljum. L-unità tal-hama' għandha tkun operata skond il-prattika tajba: l-effluwenti għandhom ikunu ċari, t-temperatura għandha tinżamm fi $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, il-pH għandu jkun 7 ± 1 , il-hama' għandha tkun qagħdet sewwa, b'arjazzjoni suffiċjenti sabiex iżzomm it-tahlita erobika matul il-hin kollu, il-protazoa għandha tkun preżenti u l-attività tal-hama għandha tkun ittestjata kontra sustanza ta' referenza mill-anqas darba kull tlett xhur. Tutilizzax il-hama' bħala inoculum sa mill-anqas xahar wiehied mill-operazzjoni, imma mhux aktar tard minn erba' xhur. Minn hemm 'il quddiem, igħor kampjun minn mill-anqas 10 siti matul intervalli regolari, darba kull tlett xhur.

▼B

Sabiex iżżomm kemm il-hama' friska u dik antika fl-istess attività, hawwad is-supernatant iffiltrat ta' hama' attivata bl-użu ta' volum egwali tas-supernatant iffiltrat mat-tahlita ta' l-ghaxar sorsi miġbura friski u wettaq il-kultura ta' dak il-likwir miġmugh kif deskritt hawn fuq. Iġbor il-hama' għall-użu bħala inoculum 18-24 siegħa wara liu l-unita tkun giet mimlija.

VII.2.4. Preparazzjoni tal-garafini

Ipprepara dawn is-sitt garafini kif ġejjin:

Nru. 1: kimika tat-test f'ilma mdewweb fi 100 mg/litru

Nru. 2, 3 u 4: kimika tat-test f'minerali mdewweb fi 100 mg/litru

Nru. 5: kimika tat-test (eż. analin) f'medja minerali mdewwba fi 100 mg/litru

Nru. 6: medja minerali biss

Żid il-kimika tat-test li ma tantx tinħall fuq il-baži ta' piż jew volum jew ittratta kif deskritt fl-Anness III, apparti li la s-solventi u l-anqas l-agenti emulsifikanti m'għandhom ikunu wżati. Żid l-assorbent tal-CO₂ mal-garafini kollha fil-kikkri speċjali kif fornuti. Aġġusta l-pH fil-garafini nri. 2, 3 u 4 għal 7,0.

VII.2.5. It-twertieq tat-test

Inokulta l-garafini nri. 2, 3 u 4 (sospensjoni tat-test, nru. 5 (kontroll ta' l-attività) u nru. 6 (inoculum fl-imbjank) b'volum żgħir ta' l-inoculum sabiex ikun hemm konċentrazzjoni ta' 30 mg/litru ta' solidi sospiżi. Inoculum N huwa miżjud mal-garafina nru. 1 li sservi bħala kontroll abjotiku. Hejji l-apparat, qabbad il-hawwadi u i-verifika li ma tgħaddix arja, u ibda bil-kejl tat-tehid ta' l-ossigenu taht kondizzjonijiet fid-dlam. I-verifika ta' kuljum, it-temperatura, l-hawwadi u r-reġistratur kowlometriku tat-tehid ta' l-ossigenu, u innota xi kambjamenti fil-kulur tal-kontenuti tal-garafini. Aqra l-akkwist ta' l-ossigenu għas-sitt garafini direttament bil-metodu xieraq, per eżempju, mill-grafika tar-reġistrazzjoni ta' sitt punti, li tipproduċi kurva BOD. Fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni, normalment 28 jum, kejjel il-pH tal-kontenuti tal-garafini u iddetermina l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test residwa u xi intermedju u, fil-każ ta' sustanza li tinħall fl-ilma, il-konċentrazzjoni ta' DOC (l-Anness II.4). Aġhti attenzjoni speċjali fil-każ ta' kimika volatili. Jekk nitrifikazzjoni tkun anticipata, iddetermina l-konċentrazzjoni tan-nitrat u tan-nitrit, jekk dan ikun possibbli.

VII.3. DATA URAPPORTAĠĠ**VII.3.1. Trattament tar-riżultati**

Iddividi l-akkwista ta' l-ossigenu (mg) tal-kimika tat-test wara hin pre-determina (korreġut għal dak ta' l-inoculum tal-kontroll fl-imbjank wara l-istess hin) bil-piż tat-kimika tat-test kif użata. Dan iforni il-BOD espress bħala mg ossigenu/mg kimika tat-test, jiġifieri

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg O}_2 \text{ tehid bil} - \text{kimika tat-test} - \text{mg O}_2 \text{ tehid bl-imbjank})}{(\text{mg kimika tat-test fil-garafina})}$$

mg O₂ per mg tal-kimika tat-test

▼B

Il-persentaġġ tal-biodegradazzjoni huwa imbagħad akkwistat minn:

$$\% \text{ biodegradazzjoni} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg kimika)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg kimika)}} \times 100\%$$

Għat-tahlitiet, ikkalkola il-ThOD mill-analizi elementali, bħal fil-każ ta' kompost sempliċi. Uża il-ThOD (ThOD_{NH4} jew ThOD_{NO3}) xierqa skond ta' jekk in-nitrifikazzjoni tkunx assenti jew kompluta (l-Anness II.2). Jekk b'danakollu, n-nitrifikazzjoni issehh imma ma tkunx kompluta, ikkalkola korrezzjoni għall-ossiġenu ikkunsmat bin-nitrifikazzjoni mit-tibdil fil-konċentrazzjoni tan-nitrit u n-nitrat (l-Anness V).

Ikkalkola l-persentaġġ tal-biodegradazzjoni primarja mit-telf ta' kimika speċifika (paterna) (ara I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Jekk issib li kien hemm xi telf tal-kimika tat-test fil-garaġina nru. 1, kejjel it-tnehhija fiziku-kimika, aghmel rapport dwar dan u uża l-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test (S_b) wara 28 jum f din il-garaġina sabiex tikkalkola l-persentaġġ tal-biodegradazzjoni.

Meta jsiru d-determinazzjonijiet ta' DOC (voluntarji), ikkalkola il-persentaġġ aħhari tal-biodegradazzjoni, minn:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100\%$$

kif deskritt taħt il-punt I.7.1. Jekk issib li kien hemm xi telf tal-DOC fil-garaġina nru. 1, kejjel it-tnehhija fiziku-kimika, uża l-konċentrazzjoni DOC f'din il-garaġina sabiex tikkalkola l-persentaġġ tal-biodegradazzjoni.

Irreġistra r-riżultati kollha dwara id-data fuq il-karti tad-data kif ipprovduta.

VII.3.2. Validità tar-riżultati

It-teħid ta' l-ossiġenu ta' l-inoculum fl-imbjank normalment huwa 20-30 mg O₂/litru u m'għandux ikun aktar minn 60 mg/litru fi 28 jum. Valuri għola minn 60 mg/litru jkun jehtieġu eżaminazzjoni kritika tad-data u tat-tekniki sperimentali. Jekk il-valur tal-pH huwa 'l barra mill-medda 6-8,5 u l-konsum ta' l-ossiġenu bil-kimika tat-test huwa anqas minn 60 %, it-test għandu jkun repetut b'konċentrazzjoni aktar baxxa tal-kimika tat-test.

Ara wkoll I.5.2.

Jekk il-presentaġġ tad-degradazzjoni ta' l-anilin ikkalkolat mill-konsum ta' l-ossiġenu ma jkunx jeċċedi 40 % wara 7 tijiet u 65 % wara 14-il jum, it-test ikun meqjus bħala invalidu.

VII.3.3. Rapportagġ

Ara I.8.

VII.4. FOLJATAD-DATA

Eżempju tal-folja tad-data huwa mogħti hawn taħt.

TEST MITI (1)

1. LABORATORJU

2. IL-JUM TAL-BIDU TAT-TEST

▼B**3. IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Isem:

Il-konċentrazzjoni tat-tahlita bil-lest: mg/l bhala kimika

Konċentrazzjoni inizjali fil-medja, C_0 : mg/l bhala kimika

Volum tat-tahlita ta' reazzjoni, V: ml

ThOD: mg O_2 /l**4. INOCULUM**

Siti tal-kampjunar tal-hama':

1) ...	6) ...
2) ...	7) ...
3) ...	8) ...
4) ...	9) ...
5) ...	10) ...

Konċentrazzjonijiet ta' solidi sospizi fil-hama' attivata wara l-akklamitizzazzjoni bid-drenaġġ sintetiku +... mg/litru

Volum tal-hama' attivata kull litru tal-medja finali =... ml

Konċentrazzjoni tal-hama' fil-medja finali =... mg/litru

5. TEHID TA' L-OSSIĠENU BIODEGRADABILITÀ

Tip ta' respirometru użat:

			(jum)				
			0	7	14	21	28
O ₂ upt. (mg), kimika tat-test	a ₁						
	a ₂						
	a ₃						
O ₂ upt. (mg), imbjank	b						
Ikkorreġut O ₂ upt. (mg)	(a ₁ - b) (a ₂ - b) (a ₃ - b)						
BOD kull mg tal- kimika tat-test	$\frac{(a - b)}{C_0 V}$	Garafina 1.					
		Garafina 2.					
		Garafina 3.					
% degradazzjoni $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		medja (*)					

(*) bhala kondizzjoni stabbli(medja).

▼B

Nota: Formati simili jistgħu ikunu wżati għall-kompost ta' referenza.

6. ANALIŻI TAL-KARBONJU (voluntarju):

Analizzatur tal-karbonju:

Garafina	DOC				% DOC imnehhi	Medja
	Imkejjeġ		Ikkorreġut			
Ilma + sustanza tat-test	a				—	—
Ilma + sustanza tat-test	b ₁		b ₁ – c			
Ilma + sustanza tat-test	b ₂		b ₂ – c			
Ilma + sustanza tat-test	b ₃		b ₃ – c			
Kontroll fl-imbjank	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC imnehhi} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. DATA SPECIFIKA KUMIKA ANALITIKA

	Ammont residwu tal-kimika tat-test fit-tmiem tat-test	% degradazzjoni
Test imbjank bl-ilma	S _b	
meda inokulata	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ degradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ikkalkola il- % tad-degradazzjoni għall-garafini a1, a2 u a3 rispettivament

8. RIMARKI

Il-kurva BOD kontra l-hin, jekk disponibbli, għandha tkun meħmuża.



ANNEX I

ABBREVIJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

- DO: Ossigenu mdewweb (mg/l) hija l-konċentrazzjoni ta' l-ossigenu mdewweb f'kampjun akweju.
- BOD: Talba biokimika ta' l-ossigenu (g) hija l-ammont ta' l-ossigenu ikkunsmat mill-mikro-organizmi meta ssir il-metabolizzazzjoni tal-kompost tat-test; espress wkoll b'hal g tehid ta' l-ossigenu kull g tal-kompost tat-test. (ara l-metodu C.5).
- COD: Talba ta' l-ossigenu Kimiku (g) hija l-ammont ta' orriġenu ikkunsmat matul l-assidizzazzjoni ta' kompost tat-test bl-aċidu dikromatiku jahraq; din tipprowdi għall-ammont tal-materja ossidizzabbli preżenti; ukoll espressa b'hal g ossigenu ikkunsmat kull g tal-kompost tat-test. (ara l-metodu C.6).
- DOC: Karbonju organiku mdewweb huwa l-karbonju organiku preżenti fit-tahlita jew li jgħaddi minn filtru ta' 0,45 mikrometri jew jibqa fis-supernatant wara ċ-ċentrifugazzjoni fi 40 000 m.s⁻² ($\pm$ 4 000 g) għal 15-il minuta.
- ThOD: Talba teoretika ta' l-ossigenu (mg) hija l-ammont totali ta' l-ossigenu meħtieġ għall-ossidizzazzjoni kompleta ta' kimika; hija ikkalkolata mill-formula molekulari (ara l-Anness II.2) u hija wkoll espress b'hal mg ossigenu meħtieġ kull mg tal-kompost tat-test.
- ThCO₂: Diossidu karbonju teoretiku (mg) hija l-kwantita ta' diossidu tal-karbonju ikkalkolat li jkun prodott mill-kontenut tal-karbonju magħruf jew imkejjet tal-kompost tat-test meta kompletament mineralizzat, ukoll espress b'hal mg diossidu tal-karbonju kull mg tal-kompost tat-test.
- TOC: Karbonju organiku totali ta' kampjun huwa s-somma tal-karbonju organiku fit-tahlita u fissospenzjoni.
- IC: Karbonju inorganiku
- TC: Karbonju totali huwa s-somma tal-karbonju organiku u inorganiku preżenti f'kampjun.

Biodegradazzjoni primarja:

hija t-tibdil fl-istruttura kimika ta' sustanza, imwassla bl-azzjoni bjoloġika, li tirriżulta mit-telf ta' proprjetà speċifika ta' dik is-sustanza.

Biodegradazzjoni finalissima (erobika):

hija l-livell tad-degradazzjoni akkwistata meta l-kompost tat-test ikun totalment utilizzat bil-mikroorganizmi li jirriżulta fil-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju, ilma, melh minerali u kostitwenti għodda mikrobjali ċellulari (biomassa).

Biodegradabbiltà Pronta:

klassifikazzjoni arbitrarja tal-kimika li tkun għaddiet minn ċerti testijiet speċifiċi tal-għażla għall-biodegradabbiltà finalissima; dawn it-testijiet huma hekk stringenti li huma assumiti li tali komposti jkunu malajr jew kompletament biodegradabbli f'ambjenti akweji permezz ta' kondizzjonijiet erobiċi.

▼B*Biodegradabbiltà Inerenti:*

klassifikazzjoni tal-kimika li dwarha jkun hemm evidenza minghajr ekwivoku tal-biodegradazzjoni (primarja jew finalissima) fi kwalunkwe test rikonoxxut tal-biodegradabbiltà.

Trattabbiltà:

hija l-amenabbiltà ta' komposti għat-tnehhija matul it-trattament bioloġiku ta' l-ilma ta' l-iskart minghajr ma tkun affettwata b'mod hażin l-operazzjoni normali tal-proċessi tat-trattament. Generalment, komposti faċilment biodegradabbli jistgħu jkunu trattati, imma mhux il-komposti inerement biodegradabbli huma hekk. Proċessi abjotiċi jistgħu ukoll ikunu operabbli.

L-ispazju

taż-żmien mill-innokulazzjoni, fit-test tat-tnehhija bil-kulur, sal-persentaġġ tad-degradazzjoni, jkun żdied b'mill anqas 10 %. L-ispazju taż-żmien huwa ta' spiss varjabbli u riproduttibbli hażin hafna.

Il-ħin tad-degradazzjoni

huwa l-ħin mit-tmien ta' l-ispazju tal-ħin sal-ħin li 90 % tal-livell massimu tad-degradazzjoni tkun għet milhuqha.

Il-perijodu ta' 10 ijiem

huma l-10 jiem li immedjetament isegwu l-akkwist ta' l-10 % degradazzjoni.



ANNEX II

KALKOLU U DETERMINAZZJONI TA' PARAMETRI SOMMARJI XIERQA

Jiddependi mill-metodu magħżul, ċerti parametri sommarji jkunu meħtieġa. Is-sezzjoni li ġejja tiddekrivi dderiva ta' dawn il-valuri. L-użu ta' dawn il-parametri hija deskritta fil-metodi individwali.

1. Kontenut tal-Karbonju

Il-kontenut tal-karbonju huwa ikkalkolat minn komposizzjoni elementali magħrufa jew determinata bl-analizi elementali tas-sustanza tat-test.

2. ThOD = Theoretical Oxygen Demand (Talba teoretika ta' l-ossiġenu)

It-Talba teoretika ta' l-ossiġenu (ThOD) tista tkun ikkalkolata jekk il-komposizzjoni elementali tkun magħrufa jew determinata b'analizi elementali. Hija għal kompost:



mingħajr nitrifikazzjoni,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

jew bin-nitrifikazzjoni,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Talba ta' l-Ossiġenu Kimiku (COD)

It-Talba ta' l-Ossiġenu Kimiku (COD) hija determinata skond il-metodu C.6.

4. DOC = Dissolved Organic Carbon (Karbonju organiku mdewweb)

Il-Karbonju organiku mdewweb (DOC) huwa bid-definizzjoni l-karbonju organiku ta' kwalunkwe kimika jew tahlita fl-ilma li tghaddi minn filtru 0,45 mikrometri.

Kampjuni mir-riċipjenti tat-test huma miġbura u iffiltrati immedjatament minn apparat tal-filtrazzjoni blużu ta' membrana filtranti xierqa. L-ewwel 20 ml (l-ammont jista jkun imnaqqas meta jsir użu minn filtranti żgħar) tal-filtrat ikunu mwarrba. Volumi ta' 10-20 ml jew anqas, jekk injettati (il-volum jiddependi mill-ammont meħtieġ għall-analizzatur tal-karbonju) huma miżmuma għall-analizzatur tal-karbonju. Il-konċentrazzjoni DOC hija determinata permezz ta' l-analizzatur tal-karbonju organiku li huwa kapaċi li jkejjel b'eżattezza l-konċentrazzjoni tal-karbonju ekwivalenti għal, jew aktar baxxa minn 10 % tal-konċentrazzjoni DOC inizjali użat fittest.

Kampjuni iffiltrati li ma jkunux jistgħu jiġu analizzati fl-istess jum utili jistgħu ikunu preservati bil-hażna fir-refrigeratur fi 2-4 °C għal 48 h, jew f'anqas minn 18 °C għal perijodu twil.

Rimarki:

Filtri tal-membra huma ta' spiss impregnati b'surfaktanti għall-idrofilizzazzjoni. B'hekk il-filtru jista jkun fih sa diversi mg ta' karbonju organiku solubbli li jkun jinterferixxi fid-determinazzjonijiet tal-biodegradabbiltà. Surfaktanti u komposti organiċi solubbli oħrajn huma mneħħija mill-filtri billi jkunu mogħllija filma dejonizzat għal tlett perijodi ta' siegħa kull wiehied. Il-filtri jistgħu mbagħad ikunu mahżuna fl-ilma għal ġimgħa wahda. Jekk ikunu wżati l-kartuċċi tal-filtri, kull lott għandu jkun ivverifikat dwar il-konformità li dan ma jkunx jirrilaxxa karbonju organiku li jinhall.

▼B

Jiddependi mit-tip tal-filtri tal-membrana, l-kimika tat-test tista' tkun miżmuma bl-assorbazzjoni. Jista' jkun għalhekk rakkomandabbli li jkun assigurat li l-kimika tat-test ma tkunx miżmuma bil-filtru.

Centrifugazzjoni fi 40 000 m.sek 2 (4 000 g) għal 15-il minuta tista' tkun użata għad-differenzazzjoni ta' TOC versus DOC minflok il-filtrazzjoni. Il-metodu mhux affidabbli fil-koncentrazzjoni inizjali ta' < 10 mg DOC/l ladarba jew mhux il-bakterja kollha tkun imneħħija jew inkella l-karbonju bħala parti tal-bakterja, plazma tkun imdewba mill-ġdid.

BIBLIOGRAFIJA

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat.Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.
- Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.
- DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs-und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1),169.



ANNEX III

EVALWAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILITÀ TA' SUSTANZI LI FTIT LI XEJN JINHALLU

Fit-testijiet tal-biodegradabbiltà b'sustanzi li ftit li xejn jinhallu, l-aspetti li ġejjin għandhom jirċievu attenzjoni speċjali.

Waqt li l-likwidi omoġenji rari jipprezentaw problemi tal-kampjunar, huwa rakommandabbli li materjali solidi jkunu omoġenizzati bil-meżzi xierqa sabiex ikunu evitati żbalji minhabba n-nuqqa ta' omoġenità.

Attenzjoni speċjali għandha tkun mogħtija meta kampjuni rappreżentattivi ta' ftit milligrammi huma meħtieġa minn tahlitiet ta' kimika jew sustanzi b'ammonti żgħir ta' impuritajiet. Diversi għamliet ta' aġitazzjoni matul it-testijiet tista tkun użata. Attenzjoni għandha tingħata għall-użu biss ta' aġitazzjoni suffiċjenti sabiex il-kimika tinżamm imxerda, u sabiex ikunu evitati shana żejda, rgħawwa eċċessiva u forzi qawwija eċċessivi.

Jista jkun użat emulsifikatur li jagħti tixrid stabbli tal-kimika. Dan m'għandux ikun tossiku għall-bakterja u m'għandux ikun biodegradabbli jew li johloq ir-rgħawwa bil-kondizzjonijiet tat-test.

L-istess kriterja hija applikabbli għal solventi bħalma hija applikabbli għall-emulsifikanti.

Mhux rakkomandat li trasportaturi solidi jkunu wżati għal sustanzi solidi tat-test imma dawn jistgħu ikunu adatti għal sustanzi żejtnija.

Meta sustanzi awżiljarji bħalma huma l-emulsifikanti, solventi u trasportaturi jkunu wżati, prova fl-imbjank li jkun fiha s-sustanza awżiljarja, għandha tkun imwettqa.

Kwalunkwe mit-tlett testijiet respiometriċi CO₂, BOD, MITI jistgħu ikunu wżati fl-istudju tal-biodegradabbiltà tal-komposti li ftit li xejn jinhallu.

BIBLIOGRAFIJA

- de Morsier, A. et al., *Biodegradation tests for poorly soluble compounds*. *Chemosphere*, 1987, vol. 16, 833.
- Gerike, P., *The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds*. *Chemosphere*, 1984, vol. 13, 169.



ANNEX IV

EVALWAZZJONI TAL-BIODEGRADABBILTÀ TA' KIMIKA SUSPETTATA LI TKUN TOSSIKA GHALL-INOCULUM

Meta kimika hija sugġetta għal testijiet ta' biodegradabbiltà faċli u tidher li ma tkunx biodegradabbli, l-proċedura li ġejja hija rakommandabbli jew distinzjoni bejn l-inibizzjoni u l-inenità tkun mixtieqa (Reynolds et al., 1987).

Inocula simili jew identika għandha tkun użata għat-testijiet tat-tossicità u l-biodegradazzjoni.

Sabiex tkun assessjata t-tossicità tal-kimika studjata f'testijiet tal-biodegradabbiltà faċli, l-applikazzjoni ta' ġemgħa waħda ta' l-inibizzjoni tar-rata tar-Respirazzjoni tal-Hama' (test ta' l-inibizzjoni tar-respirazzjoni talhama attivata – Dir 88/302/EEC), BOD u/jew il-metodi ta' l-Inibizzjoni tat-Tkabir, għandhom ikunu jidhru jidhru xierqa.

Jekk l-inibizzjoni minhabba t-tossicità għandha tkun evitata, huwa sugġerit li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test użata fit-testijiet tal-biodegradabbiltà faċli għandha tkun mhux anqas minn 1/10 tal-valuri EC_{50} (jew anqas mill-valuri EC_{20}) akkwistati fit-testijiet tat-tossicità. Komposti b'valur EC_{50} jew akbar minn 300 mg/l aktarx li ma jkollhomx effetti tossiċi fit-testijiet tal-biodegradabbiltà faċli.

Il-valuri EC_{50} ta' anqas minn 20 mg/l huma aktarx li jimponu problemi serji għal testijiet sussegwenti. Konċentrazzjoni tat-test baxxi għandhom ikunu użati, li johlqu l-htiega ta' l-użu tat-test stringenti u sensitiv tal-Flixkun Magħluq jew l-użu ta' 14C – materjal bit-tikketa. B'mod alternattiv, *inoculum* akklamitizzat jista jippermetti li jkunu użati konċentrazzjonijiet oghla tas-sustanza tat-test. F'dan il-każ ta' l-aħhar, b'danakollu, l-kriterja speċifika tat-test tal-biodegradabbiltà faċli li tintilef.

BIBLIOGRAFIJA

Reynolds, L. et al., *Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability*. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

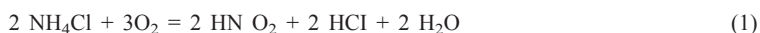


ANNEX V

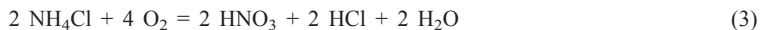
KORREZZJONI TAT-TEHID TA' L-OSSIĠENU GHALL-INTERFERENZA BIN-NITRIFIKAZZJONI

Żbalji minhabba li ma tkunx ikkonsidrata n-nitrifikazzjoni fil-kalkolazzjoni tat-tehid ta' l-ossiġenu bilbiodegradabbiltà tas-sustanzi tat-test li ma jkun fihom N huma marginali (mhux akbar minn 5 %), anki jekk l-ossidazzjoni ta' l-ammonju-N fil-medja issehh b'mod erratiku bħal bejn ir-reċipjenti tat-test u l-imbjank. B'danakollu, għal sustanzi tat-test li jkun fihom N, żbalji serji jistghu isehhu.

Jekk in-nitrifikazzjoni tkun sehhet imma ma tkunx kompluta, t-tehid osservat ta' l-ossiġenu bit-tahlita tarreazzjoni jista' jkun ikkoerruġut għall-ammont ta' l-ossiġenu użat fl-ammonju ossidizzanti għan-nitrit u nnitrat, jekk il-bidliet fil-konċentrazzjoni matul l-inkubazzjoni tan-nitrit u n-nitrat huma determinati bilkonsiderazzjoni ta' dawn l-ekwazzjonijiet li ġejjin:



Globalment:



Mill-ekwazzjoni (1), l-akkwist ta' l-ossiġenu bit-28 g ta' nitroġenu li jkun jinsab fil-klorid ta' l-ammonium (BH_4Cl) li jkun ossidizzat għan-nitrit huwa 96 g, i.e. fattur ta' 3,43 (96/28). Bl-istess mod, mill-ekwazzjoni (3), l-akkwist ta' l-ossiġenu bit-28 g ta' nitroġenu li jkun ossidizzat għan-nitrit huwa 128 g, i.e. fattur ta' 4,57 (128/28).

Ladarba r-reazzjonijiet huma sekwenzali, li jkunu esegwiti minn speċje ta' bakterja distinta u differenti, huwa possibbli għall-konċentrazzjoni tan-nitrit li tiżdied jew tonqos; f'dan il-każ ta' laħhar, konċentrazzjoni ekwivalenti tan-nitrat ikun iffurmat. Għalhekk, l-ossiġenu ikkunsmat fil-formazzjoni ta' ornitrat hija 4,75 multiplikata biż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat, filwaqt li l-ossiġenu assoċjaat mal-formazzjoni tan-nitri hija 3,43 multiplikata biż-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit jew bit-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tagħha, itself ta' l-ossiġenu huwa - 3,43 multiplikat bit-tnaqqis fil-konċentrazzjoni.

Dan ifisser:

$$\text{O}_2 \text{ ikkunsmat fil-formazzjoni tan-nitrat} = 4,57 \times \text{iz-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrat} \quad (4)$$

u

$$\text{O}_2 \text{ ikkunsmat fil-formazzjoni tan-nitrit} = 3,43 \times \text{iz-żieda fil-konċentrazzjoni tan-nitrit} \quad (5)$$

u

$$\text{O}_2 \text{ mitluf fl-ghebien tan-nitrit} = - 3,43 \times \text{it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tan-nitrat} \quad (6)$$

Sabiex

$$\text{O}_2 \text{ akkwistat minhabba n-nitrifikazzjoni} = \pm 3,43 \times \text{il-kambjament fin-nitrit ikkonċentrat} + 4,57 \times \text{iz-żieda fin-nitrat ikkonċentrat} \quad (7)$$

u għalhekk

$$\text{O}_2 \text{ akkwistat minhabba l-ossidizzazzjoni C} = \text{l-akkwist totali osservat} - \text{l-akkwist minhabba nnitrifikazzjoni} \quad (8)$$

B'mod alternattiv, jekk it-total biss ta' l-N ossidizzat huwa determinat, l-akkwista ta' l-ossiġenu minhabba nnitrifikazzjonijista' jkun meqjus bħala, fl-ewwel approssimazzjoni, $4,57 \times \text{iz-żieda fl-N ossidizzat}$.

Il-valur ikkorreġut għall-konsum ta' l-ossiġenu minhabba l-ossidizzazzjoni ta' C huwa mbagħad imqabbel mal- ThOD NH_3 , kif ikkalkolat fl-Anness II.

▼B**C.5. DEGRADAZZJONI – TALBA TA' L-OSSIĠENU BIOKEMIKA****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

L-iskop tal-metodu huwa l-kejl tat-talba ta' l-ossiġenu biokemikali (BOD) ta' sustanzi organiċi solidi u likwidi.

L-informazzjoni elaborata b'dan it-test tappartjeni għal komposti li jinhallu fl-ilma b'dana kollu, komposti volatili u dawk b'solubbiltà baxxa fl-ilma jistgħu wkoll, għall-anqas fil-prinċipju, jkunu ittestjati.

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk il-materja organiċi tat-test li ma humiex inibitorji għall-bakterja fil-konċentrazzjoni użata fit-test. Jekk il-materjal tat-test ma jkunx jinhall fil-konċentrazzjoni tat-test, miżuri speċjali, bħalma hu l-użu ta' dispersjoni ultrasonika, jistgħu jkunu wżati sabiex tkun akkwistata dispersjoni tajba tal-materjal tat-test.

Informazzjoni dwar it-tossicità tal-kimika tista tkun utili għall-interpretazzjoni ta' riżultati baxxi u fil-għażla tal-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test.

1.2. DEFINIZZJONI U UNITAJIET

Il-BOD huwa definit bħala l-massa ta' ossiġenu mdewweb mehtieg minn volum speċifikat tat-tahlita tas-sustanza għall-proċess ta' l-ossidizzazzjoni biokimika skond il-kondizzjonijiet preskritti.

Dawn ir-riżultati huma espressi bħala grammi tal-BOD f'kull gramma tas-sustanza ittestjata.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

L-użu ta' sustanza ta' referenza xierqa għall-verifika ta' l-attività ta' l-inoculum hija mixtieqa.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ammont predominanti tas-sustanza, mdewweb jew imxerred b'medja adatta sew-arjata, huwa innokulat mal-mikro-organizmi u inkubat f'temperatura kostanti ambjenti definita, f'post fid-dlam.

Il-BOD huwa determinat bid-differenza tal-kontenut ta' l-ossiġenu mdewweb fil-bidu u fit-tmien tat-test. It-tul ta' żmien tat-test għandu jkun mill-anqas hamest ijiem u mhux aktaar minn 28 jum.

Imbjank għandu jkun determinat f'assagg parallel li ma jkun fih l-ebda sustanza tat-test.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Id-determinazzjoni BOD ma tistgħax tkun meqjusa bħala determinazzjoni valida tal-biodegradabbiltà ta' sustanza. Dan it-test jista biss ikun meqjus bħala test ta' prova.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Tahlita jew tixrid preliminari tas-sustanza huwa ippreparat sabiex tkun akkwista l-konċentrazzjoni BOD kompatibbli mal-metodu użat. Il-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

▼B**2. DATA U EVALWAZZJONI**

Il-BOD li jkun jinsab fit-tahlita preliminari huwa kalkolat skond il-metodu normalizzat magħżul, u konvertit fi grammi ta' BOD kull gramma tas-sustanza tat-test.

3. RAPPORTAĠĠ

Il-metodu użat għandu jkun mistqarr.

Il-talba għall-ossigenu biokemikali għandha tkun il-medja ta' mill-anqas tlett kejl validi.

L-informazzjoni u r-rimarki kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu irrappurtati, speċjalment f'dak li jirrigwardja l-impuritajiet, l-istat fiżiku, l-effetti tossiċi u l-komposizzjoni inerenti tas-sustanza li jkunu jaffettwaw ir-riżultati.

L-użu ta' addittiv għall-inibizzjoni tan-nitrifikazzjoni bioloġika għandu jkun irrappurtat.

4. REFERENZI

Lista ta' metodi standardizzati, per eżempju:

NF T 90-103: Determinazzjoni tat-talba ta' l-ossigenu biokemikali.

NBN 407: Talba ta' l-ossigenu biokemikali.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

Id-determinazzjoni tat-talba ta' l-ossigenu biokemikali, il-Metodu S għall-eżaminazzjoni ta' l-ilma u l-materjali assoċjati, HMSO, Londra.

ISO 5815: Determinazzjoni tat-talba ta' l-ossigenu biokemikali wara n jiem.

▼B**C.6. DEGRADAZZJONI — TALBA TA' L-OSSIGĠENU KEMIKALI****1. METODU****1.1. INTRODUZZJONI**

L-iskop tal-metodu huwa l-kejl tat-talba ta' l-ossigenu kemikali (COD) ta' sustanzi organiċi solidi u likwidi f'manjera normali, arbitrara, skond kondizzjonijiet fissi tal-laboratorju.

Informazzjoni dwar il-formula tas-sustanza tkun utili għat-twettieq tat-test u l-interpretazzjoni tar-riżultat akkwistat (eż. imluha aloġenizati, imluha ferrużi ta' komposti organiċi, komposti organoklorini).

1.2. DEFINIZZJONIJIET U U NITAJIET

It-talba ta' l-ossigenu kemikali hija l-kejl ta' l-ossidabbiltà ta' sustanza, espressa fl-ammont ekwivalenti ta' ossigenu ta' reagent ossidizzanti ikkunsmat mis-sustanza skond kondizzjonijiet fissi tal-laboratorju.

Ir-riżultat huwa espress bħala grammi tal-COD kull gramma tas-sustanza ittestjata.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Sustanzi ta' referenza ma jeħtieġux li jkunu wżati fil-kazi kollha meta tkun investigata sustanza ġdida. Dawn għandhom primarjament iservu għall-kalibrazzjoni tal-metodu minn żmien għal żmien u sabiex jippermettu l-paragun mar-riżultati tal-metodu applikat.

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Ammont predeterminat tas-sustanza, imdewba jew imxerda fl-ilma, huwa ossidizzat bid-dikromat tal-putass f'medja qawwiya ta' l-aċidu sulfuriku bis-sulfat tal-fidda bħala katalist, taħt refluż għal sagħtejn. Id-dikromat residwu huwa determinat bit-titrizzjoni mas-sulfat ta' l-ammonium ferruż standardizzat.

Fil-każ ta' sustanzi li jkun fihom il-klorin⁽¹⁾, sulfat tal-merkurju huwa miżjud sabiex titnaqqas l-interferenza tal-klorid.

1.5. KRITERJA TAL-KWALITÀ

Minhabba l-manjiera arbitrara tad-determinazzjoni, il-COD huwa “indikatur ossidizzabbli” u bħala tali użat bħala metodu prattiku fil-kejl tal-materja organika.

Il-klorid jista' jinterferixxi f'dan it-test, aġenti inorganiċi tat-tnaqqis jew ta' l-ossidizzazzjoni jistgħu ukoll jinterferixxu mad-determinazzjoni tal-COD.

Uħud mill-kompost ċikliċi u ħafna mis-sustanzi volaiti (eż. aċidi xahmija baxxi) ma humiex kompletament ossidizzati b'dan it-test.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

Tahlita jew tixrid preliminarji tas-sustanza huma ippreparati sabiex ikun akkwistat COD bejn 250 u 600 mg kull litru.

⁽¹⁾ Wara l-użu, is-soluzzjonijiet li fihom *salts* tal-merkurju għandhom jiġu trattati sabiex jiġi evitat it-tixrid tal-merkurju fl-ambjent. Altrimenti l-BOD huwa mbagħad determinat skond kwalunkwe metodu xieraq standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

▼B*Rimarki:*

Fil-każ ta' sustanza li ma tantx tinhall u mhux-dispersibbli, ammont ta' sustanza miġjuba trab fin jew sustanza likwida korrespondenti għal madwar 5 mg ta' COD tista tkun miżuna u poġġuta fl-apparat esperimentali bl-ilma.

It-talba ta' l-ossigeni kemikali (COD) hija ta' spiss u speċjalment fil-każ ta' sustanzi li ma tantx jinhallu, determinata b'mod vantaġġuż ġewwa varjant tal-metodu, i.e., f'sistema magħluqa bl-ekwalizzatur tal-pessjoni (H. Kelkenberg, 1975). F'din il-modifika, l-komposti huma determinati biss b'diffikulta bil-metodu konvenzjonali. – eż. aċidu aċetiku – jista ta' spiss ikun kwantifikat b'suċċess. Il-metodu wkoll jonqos, b'dana kollu, fil-każ tal-pridin Jekk il-koncentrazzjoni tad-dikromat tal-putassa, kif preskritt fir-ref. (1), huma mtella għal 0,25 N (0,0416 M), l-użin dirett ta' 5-10 mg tas-sustanza huwa faċilitat, li huwa essenzjali għad-determinazzjoni tal-COD ta' sustanzi li ma tantx jinhallu fl-ilma (ref. (2)).

Altrimenti l-BOD huwa mbaġħad determinat skond kwalunkwe metodu xieraq standardizzat nazzjonali jew internazzjonali.

2. DATA U EVALWAZZJONI

Il-COD li jkun jinsab fil-garafina sperimentali huwa ikkalkolat skond il-metodu normalizzat magħżul, u ikkonvertit fi grammi ta' COD kull gramma tas-sustanza tat-test.

3. RAPPORTAĠĠ

Il-metodu użat għandu jkun mistqarr.

It-talba għall-ossigeni kemikali għandha tkun il-medja ta' mill-anqas tlett kejl validi. L-informazzjoni u r-rimarki kollha rilevanti għall-interpretazzjoni tar-riżultati għandhom ikunu irrappurtati, speċjalment f'dak li jirrigwardja l-impurità, l-istat fiżiku, l-effetti tossiċi u l-komposizzjoni inerenti tas-sustanza. li jkunu jaffettwaw ir-riżultati.

L-użu tas-sulfat tal-merkurju għal minimizzar ta' l-interferenza tal-klorid għandu jkun rapportat.

4. REFERENZI

- (1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146
- (2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Lista ta' metodi standardizzati, per eżempju:

NBN T 91-201 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossigenu.

ISBN 0 11 7512494 Id-domanda kemikali ta' l-ossigenu (il-valur tad-dichromate) ta' l-ilmijiet imniġġsa u waste waters.

NFT 90-101 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossigenu.

DS 217 = L-analizi ta' l-ilma Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossigenu.

DIN 38409-H-41 Id-determinazzjoni tad-domanda kemikali ta' l-ossigenu (COD) fil-medda li tasal iktar minn 15 mg kull litru.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Kwalità ta' l-ilma: talba ta' l-ossigeni kemikali metodi dikromati.

▼B**C.7. ID-DEGRADAZZJONI – ID-DEGRADAZZJONI ANTIBIJOTIKA:
L-IDROLISI BĦALA FUNZJONI TAL-PH****1. METODU**

Dan il-metodu tat-test huwa ekwivalenti għall-OECD TG 111 (2004).

1.1. DAHLA

Il-kimiċi jistgħu jidhlu fl-ilmijiet tal-wiċċ b'tali metodi bħall-applikazzjoni diretta, l-irxiex, l-ilma li jiskula, id-drenagg, ir-rimi ta' l-iskart, l-effluwent industrijali, domestiku jew agrikolu u d-depożizzjoni atmosferika u jistgħu jiġu ttrasformati f'dawk l-ilmijiet minn proċessi kimiċi (eż. l-idrolisi, l-ossidazzjoni), fotokimiċi u/jew mikrobjali. Din il-Linja Gwida tiddeskrivi metodu tat-test fil-laboratorju biex jiġu stmati trasformazzjonijiet idrolitiċi abjotiċi tal-kimiċi f'sistemi akkwatiċi ta' valuri pH normalment misjuba fl-ambjent (pH 4 – 9) u hija bbażata fuq Linji Gwidi eżistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

L-esperimenti huma mwettqa sabiex jiġu ddeterminati (i) ir-rata ta' l-idrolisi tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-pH u (ii) l-identità jew in-natura u r-rati tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti ta' l-idrolisi li għalihom jistgħu jiġu esposti l-organizmi. Dawn l-istudji jistgħu jkunu meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati għall-ilma jew li x'aktarx jilhqgħu l-ambjent b'mezzi oħrajn deskritti hawn fuq.

1.2. DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Ara l-Anness 2

1.3. L-APPLIKABILITÀ TAL-METODU

Il-metodu ġeneralment jghodd għal sustanzi kimiċi (minghajr tikketta jew bit-tikketta) li għalihom huwa disponibbli metodu analitiku bi preċizzjoni u sensitività biżżejjed. Jghodd għall-komposti fit volatili u mhux volatili ta' solubbiltà suffiċjenti fl-ilma. It-test ma għandux jghodd għall-kimiċi li huma volatili hafna mill-ilma (eż. fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistax jinżamm fit-tahlita taħt il-kondizzjonijiet esperimentali ta' dan it-test. It-test jista' jkun diffiċli li jitwettaq b'sustanzi ta' solubbiltà minima fl-ilma (8).

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Tahlitiet *buffer* solubbli bl-ilma ta' valuri pH differenti (pH 4, 7 u 9) huma trattati bis-sustanza tat-test u inkubati fid-dlam taħt kondizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati (b'temperaturi kostanti). Wara intervalli xierqa ta' zmien, it-tahlitiet *buffer* huma analizzati għas-sustanza tat-test u għall-prodotti ta' l-idrolisi. Bis-sustanza tat-test ittikkettjat (eż. ^{14}C), jista' jiġi stabbilit bilanċ tal-massa b'mod aktar faċli.

Dan il-metodu tat-test huwa diżinjat bħala strateġija f'saffi li tintwera u hija spjegata fl-Anness 1, Kull saff huwa mibdi mir-riżultati tas-saff ta' qablu.

▼B**1.5. L-INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST**

Is-sustanza tat-test minghajr tikketta jew bit-tikketta tista' tintuża biex titkejjel ir-rata ta' l-idrolisi. Il-materjal ittikkettjat generalment huwa preferut għall-istudju tar-rotta ta' l-idrolisi u biex jitwaqqaf il-bilanċ tal-massa; iżda, f'każijiet speċjali, l-ittikkettjar jista' ma jkunx assolutament neċessarju. L-ittikkettjar ta' ^{14}C huwa rrakkomandat iżda l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ^{13}C , ^{15}N , ^3H , jista' jkun utli wkoll. Sa fejn possibbli, it-tikketta għandha tkun pożizzjonata fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekula. Per eżempju, jekk is-sustanza tat-test fiha ċirku wiehed, it-tikkettjar fuq dan iċ-ċirku huwa mehtieġ; jekk is-sustanza tat-test fiha żewġ ċrieki jew aktar, jistgħu jkunu mehtieġa studji separati biex jiġi evalwat id-destin ta' kull ċirku ttikkettjat u biex jinkiseb l-informazzjoni xierqa dwar il-formazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi. Is-safa tas-sustanza tat-test għandha tkun mhux inqas minn 95 %.

Qabel ma jsir it-test ta' l-idrolisi, għandha tkun disponibbli din l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test:

- a) is-solubbiltà fl-ilma [Il-Metodu tat-Test A.6];
- b) is-solubbiltà fis-solventi organiċi;
- ċ) il-prensa tal-fwar [Metodu tat-Test A.4] u/jew il-kostant tal-Liġi ta' Henry;
- d) il-koeffiċjenti tal-qsim n-octanol/ilma [Il-Metodu tat-Test A.8];
- e) il-kostant tad-dissoċjazzjoni (pK_a) [Linja Gwida 112 ta' l-OECD] (9);
- f) rata ta' fototrasformazzjoni diretta u indiretta fl-ilma fejn xieraq.

Il-metodi analitiċi għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza tat-test u, jekk huwa rilevanti, għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi f'tahlitiet bl-ilma għandhom ikunu disponibbli (ara wkoll it-taqsim 1.7.2).

1.6. IS-SUSTANZI TA' RIFERENZA

Fejn possibbli, is-sustanzi ta' riferenza għandhom jintużaw għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi bil-metodi spettroskopiċi u kromatografiċi jew metodi oħrajn sensitivi b'mod xieraq.

1.7. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ**1.7.1. L-irkupru**

L-analizi ta', għall-inqas, soluzzjonijiet *buffer* doppji jew ta' l-estratti tagħhom immedjatement wara ż-żjeda tas-sustanza tat-test tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetibbiltà tal-metodu analitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupru għal stadji aktar tard ta' l-esperimenti jingħata bil-bilanċi tal-massa rispettivi (meta jintuża materjal ittikkettjat). L-irkupru għandu jvarja minn 90 % sa 110 % għal kimiċi ttikkettjati u mhux ittikkettjati (7). Fil-każ li huwa teknikament diffiċli li tintlaħaq din l-iskala, irkupru ta' 70 % għall-kimiċi mhux ittikkettjati, iżda għandha tingħata ġustifikazzjoni.

▼B

1.7.2. **Ir-repetibbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repetibbiltà tal-metodu/i analitiku/i biex tiġi kkwantifikata s-sustanza tat-test u l-prodotti ta' l-idrolisi f'hinijiet aktar tard tista' tiġi vverifikata bl-analiżi doppja ta' l-istess tahlitiet *buffer* (jew ta' l-estratti tagħhom) wara li biżżejjed kwantitajiet ta' prodotti ta' l-idroliġi jkunu ffurmaw għall-kwantifikazzjoni.

Il-metodu analitiku għandu jkun sensitiv biżżejjed biex il-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test jiġu kkwalifikati sa 10 % jew inqas mill-konċentrazzjonijiet inizjali. Jekk huwa rilevanti, il-metodi analitiċi għandhom ukoll ikunu sensitivi biżżejjed biex jiġi kkwantifikat kwalunkwe prodott ta' l-idrolisi li jirrappreżenta 10 % jew aktar mill-applikati (fi kwalunkwe hin matul l-istudju) sa 25 % jew inqas mill-konċentrazzjoni l-aktar għolja tagħha.

1.7.3. **L-intervalli ta' kunfidenza għad-data kinetika ta' l-idrolisi**

L-intervalli ta' kunfidenza għandhom jinhadmu u jiġu pprezentati għall-koeffiċjenti kollha tar-rigressjoni, il-kostanti tar-rati, il-*half-lives*, u kwalunkwe parametri kinetiċi oħrajn (eż. DT50).

1.8. **ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**1.8.1. **It-tagħmir u l-apparat**

L-istudju għandu jsir f'kontenituri tal-ħġieġ (eż. tubi tat-testijiet, fliexken żgħar) taħt kundizzjonijiet mudlama u sterili, jekk meħtieġ, kemm-il darba l-informazzjoni preliminari (bħall-koeffiċjenti tal-qsim ta' l-n-octanol-ilma) ma tindikax li s-sustanza tat-test tista' tehel mal-ħġieġ. F'dawn il-każijiet, jistgħu jkunu jridu jitqiesu materjali alternattivi (bħal Teflon). Jista' wkoll ikun possibbli li tittaffa l-problema ta' twaħhil mal-ħġieġ bl-użu ta' wieħed jew aktar minn dawn il-metodi:

- id-determinazzjoni tal-massa tas-sustanza tat-test u tal-prodotti ta' l-idrolisi sorbiti mal-kontenitur tat-test;
- l-użu ta' banju ultrasoniku;
- tiġi żgurata hasla bis-solventi ta' l-oġġetti kollha tal-ħġieġ f'kull intervall tat-tehid tal-kampjuni;
- l-użu ta' prodotti formulati;
- l-użu ta' ammont akbar ta' kosolvent għaž-żjieda tas-sustanza tat-test mas-sistema; jekk jintuża kosolvent għandu jkun kosolvent li ma jidrolizzax is-sustanza tat-test.

Normalment huma meħtieġa oġġetti li jaġitaw il-banju ta' l-ilma u kkontrollati mit-temperatura jew inkubaturi kkontrollati termostatika-għall-inkubazzjoni tat-tahlitiet differenti tat-test.

Huwa meħtieġ tagħmir standard tal-laboratorju, inkluż b'mod partikolari, dawn li ġejjin

- miter tal-pH;

▼B

- strumenti analitiċi bħal tagħmir GC, HPLC, TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' l-iskoperta biex jiġu analizzati sustanzi radio-tikkettjati u mhux tikkettjati jew il-metodu tat-tahlit ta' l-izotopi inversi;
- l-istrumenti għall-iskopijiet ta' l-identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);
- kalkulator tal-fluorexxenza tal-likwidu;
- lembub li jisseparaw għall-estrazzjoni ta' likwidi-likwidi;
- strumentazzjoni biex jiġu kkonċentrati t-tahlitiet u l-estratti (eż. evaporator li jdur);
- tagħmir li jikkontrolla t-temperatura (eż. banju ta' l-ilma).

Ir-reagenti kimiċi jinkludu, per eżempju:

- solventi organiċi, grad analitiku, bħal hexane, dichloromethane, eċċ.;
- likwidu tal-fluorexxenza;
- tahlitiet *buffer* (għad-dettalji ara t-taqsim 1.8.3).

L-oġġetti kollha tal-ħġieġ, l-ilma tal-grad ta' reagent u t-tahlitiet *buffer* użati fit-testijiet ta' l-idrolisi għandhom jiġu sterilizzati.

1.8.2. L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test

Is-sustanza tat-test għandha tiġi applikata bħala tahlita ilmija fit-tahlitiet *buffer* differenti (ara l-Anness 3). Jekk huwa meħtieġ għat-tahlit xieraq, l-użu ta' ammonti żgħar ta' solventi li jithallu fl-ilma (bħall-acetonitrile, acetone, etanol) huwa permess għall-applikazzjoni u d-distribuzzjoni tas-sustanza tat-test iżda dan ma għandux normalment jeċċedi 1 % v/v. Fil-każ li titqies konċentrazzjoni oghla ta' solventi (eż. fil-każ ta' sustanzi tat-test li ma tantx jinhallu), dan jista' jkun permess biss meta jista' jintwera li s-solvent ma għandu ebda effett fuq l-idrolisi tas-sustanzi tat-test.

L-użu ta' prodott formulat mhuwiex rakkomandat bħala rutina, għaliex ma jistax jiġi eskluż li l-ingredjenti tal-formulazzjoni jistgħu jinfluwenzaw il-proċess ta' l-idrolisi. Madankollu, għas-sustanzi tat-test li ma tantx jinhallu fl-ilma jew għal sustanzi li jehlu mal-ħġieġ (ara t-taqsim 1.8.1), l-użu ta' materjal formulat jista' jkun alternattiv xieraq. Għandha tintuża konċentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test;

ma għandhiex teċċedi 0,01 M jew nofs il-konċentrazzjoni tas-saturazzjoni (ara l-Anness 1).

▼B**1.8.3. It-tahlitiet buffer**

It-test ta' l-idrolisi għandu jitwettaq f'valuri pH ta' 4, 7 u 9. Għal dan l-iskop, it-tahlitiet *buffer* għandhom jiġu ppreparati bl-użu ta' kimiċi tal-grad ta' reaġenti u ilma. Xi sistemi utli *buffer* huma ppreżentati fl-Anness 3. Għandu jiġi nnutat li s-sistema *buffer* uzata tista' tinfluenza r-rata ta' l-idrolisi u fejn dan huwa osservat għandha tintuża sistema alternata ta' *buffer* ⁽¹⁾.

Il-pH ta' kull tahlita *buffer* għandu jiġi vverifikat b' pH meter ikkalibrat sa preċiżjoni sa għall-inqas 0,1 fit-temperatura mehtieġa.

1.8.4. Il-kondizzjonijiet tat-test**1.8.4.1. It-temperatura tat-test**

L-esperimenti ta' l-idrolisi għandhom isiru f'temperaturi kostanti. Għall-iskopijiet ta' l-estrapolazzjoni, huwa importanti li tinzamm it-temperatura sa għall-inqas $\pm 0,5$ °C.

Test preliminari (Livell 1) għandu jitwettaq f'temperatura ta' 50 °C jekk l-imġieba idrolitika tas-sustanza tat-test mhijiex magħrufa. It-testijiet kinetiċi ta' Livell Oghla għandhom isiru f'mhux inqas minn tliet temperaturi (inkluż it-test ta' 50 °C) sakemm is-sustanza tat-test hija stabbli għall-idrolisi kif determinat mill-ittestjar tal-Livell 1. Skala sugġerita tat-temperatura hija 10-70 °C (preferibbilment f'għall-inqas temperatura waħda inqas minn 25 °C użat), li jinkludi t-temperatura tar-rapportar ta' 25 °C u l-parti l-kbira tat-temperaturi misjuba fil-qasam.

1.8.4.2. Dawl u ossiġenu

It-testijiet ta' l-idrolisi għandhom isiru bl-użu ta' kwalunkwe metodu xieraq biex jiġu evitati effetti fotolitici. Il-miżuri kollha xierqa għandhom jittiehdu biex jiġi evitat l-ossiġenu (eż. bit-tbaqbiq tal-helium, nitroġenu jew argon għal 5 minuti qabel il-preparazzjoni tat-tahlita).

1.8.4.3. Kemm idum it-test

It-test preliminari għandu jsir għal 5 ijiem filwaqt li t-testijiet tal-Livell Oghla għandhom isiru sad-90 % idrolisi tas-sustanza tat-test jew għal 30 jum, skond x'jiġi l-ewwel.

1.8.5. It-twettiq tat-test**1.8.5.1. It-test preliminari (Livell 1)**

It-test preliminari jsir f'temperatura ta' $50 \pm 0,5$ °C u pH 4,0, 7,0 u 9,0. Jekk inqas minn 10 fil-mija ta' l-idrolisi jiġi osservat wara 5 ijiem ($t_{0,5}$ f'temperatura ta' 25 °C > 1 sena) is-sustanza tat-test titqies idrolitikament stabbli u, normalment, ma hu mehtieġ ebda ttestjar addizzjonali. Jekk is-sustanza hija magħrufa li hija instabbli f'temperaturi ambjentalment rilevanti ⁽²⁾, it-test preliminari mhuwiex mehtieġ. Il-metodu analitiku għandu jkun preċiż u sensitiv biżżejjed biex jiġi skopert tnaqqis ta' 10 fil-mija fil-koncentrazzjoni inizjali.

⁽¹⁾ Mabey u Mill jirrakkomandaw l-użu ta' buffers tal-borate u ta' l-aċetat minflok il-fosfat (11).

⁽²⁾ Din l-informazzjoni tista' tiġi minn ghejun oħrajn bħad-data ta' l-idrolisi ta' komposti strutturalment simili mil-letteraturi jew minn testijiet oħrajn preliminari, semi-kwantattivi bis-sustanza tat-test fi stadju aktar bikri ta' l-izvilupp.

▼B

1.8.5.2. *L-idrolisi ta' sustanzi mhux stabbli (Livell 2)*

It-test tal-Livell Oghla (avvanzat) għandu jsir fil-valuri pH li fihom is-sustanza tat-test tinstab instabbli kif definit mit-test preliminari hawn fuq. It-tahlitiet *buffered* tas-sustanza tat-test għandhom ikunu termostata fit-temperaturi magħżula. Biex isir it-test għall-imġieba ta' l-ewwel ordni, kull reazzjoni tat-tahlita għandha tiġi analizzata f'intervalli ta' żmien li jipprovdu minimu ta' sitt punti ta' data spazjati bejn 10 % u 90 % ta' l-idrolisi tas-sustanza tat-test. Il-kampjuni replikati tat-test individwali (minimu ta' kampjuni duplikati li jinsabu f'kontenituri separati tar-reazzjoni) għandhom jitnehhew u l-kontenuti jiġu analizzati f'kull wiehed mis-sitt drabi tat-tehid tal-kampjuni (għal mhux inqas minn tnax-il punt tad-data doppja). L-użu ta' kampjun kbir wiehed li minnhom jitnehhew *l-aliquots* individwali tat-tahlita tat-test f'kull intervall tat-tehid tal-kampjuni jitqies li mhux xieraq, għaliex ma jippermettix l-analiżi tal-varjabbiltà tad-data u jista' jwassal għal problemi bil-kontaminazzjoni tat-tahlita tat-test. It-testijiet tal-konferma ta' l-isterilità għandhom isiru fl-aħħar tat-test tal-Livell oghla (jiġifieri f'90 % idrolisi jew 30 jum). Izda, jekk ma tiġi osservata ebda degradazzjoni (jiġifieri t-trasformazzjoni), it-testijiet ta' l-isterilità ma jitqisux mehtieġa.

1.8.5.3. *L-identifikazzjoni tal-prodotti ta' l-idrolisi (Livell 3)*

Kwalunkwe prodott ewlieni ta' l-idrolisi għall-inqas dawk li jirrapprezentaw > 10 % tad-doża applikata għandu jiġi identifikat b'metodi xierqa analitika.

1.8.5.4. *Testijiet mhux obbligatorji*

It-testijiet addizzjonali f'valuri pH minbarra 4, 7 u 9 jistgħu jkunu mehtieġa għal sustanza tat-test idrolitikament instabbli. Per eżempju, għall-iskopijiet fiżjoloġiċi jista' jkun mehtieġ test taht kondizzjonijiet aktar aċidużi (eż. pH 1.2) bl-użu ta' temperatura unika fiżjoloġikament rilevanti (37 °C).

2. **DATA**

L-ammonti tas-sustanza tat-test u tal-prodotti ta' l-idrolisi, jekk rilevanti, għandhom jingħataw bħala perċentwal tal-koncentrazzjoni inizjali applikata u, fejn xieraq, bħala mg/L għal kull intervall tat-tehid tal-kampjuni u għal kull pH u temperatura tat-test. Barra minn dan, għandu jingħata bilanċ tal-massa f'perċentwali tal-koncentrazzjoni inizjali applikata meta ntuzat sustanza tat-test ittikkettjata.

Prezentazzjoni grafika tad-data ta' logs trasformati tal-koncentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test maż-żmien għandha tiġi rrapportata. Kwalunkwe prodott ewlieni ta' l-idrolisi għall-inqas dawk li jirrapprezentaw ≥ 10 % tad-doża applikata li għandu jiġi identifikat bil-koncentrazzjonijiet tal-logs trasformati għandu wkoll jista' jiġi ppjanat bl-istess mod bħas-sustanza ewlenija biex jidhru r-rati tal-formazzjoni u tat-tnaqqis tagħhom.

▼B

2.1. IT-TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Determinazzjonijiet aktar preċiżi ta' *half-lives* jew ta' valuri DT_{50} għandha tinkiseb bl-applikazzjoni ta' kalkoli xierqa tal-mudelli kinetiċi il-valuri *tal-half-life* u/jew DT_{50} (inklużi l-limiti tal-kunfidenza) għandhom jiġu rrapportati għal kull pH u kull temperatura flimkien ma' deskrizzjoni tal-mudell użat, l-ordni tal-kinetika u l-koeffiċjenti tad-determinazzjoni (r^2). Jekk xieraq, il-kalkoli għandhom ukoll jiġu applikati għall-prodotti ta' l-idrolisi.

Fil-każ ta' studju ta' rati mwettqa f temperaturi differenti, il-kostanti ta' l-idrolisi tal-pseudo-ewwel ordni (k_{obs}) għandhom jiġu deskritti bħala funzjoni tat-temperatura. Il-kalkolu għandu jiġi bbażat fuq kemm is-separazzjoni tal-kobs f kostanti tar-rati għall-idrolisi katalizzata bl-aċidu, newtrali u kkatalizzati bil-baži (k_H , $k_{neutral}$, u k_{OH} rispettivament) u l-ekwazzjoni ta' Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H, neutral, OH} A_i e^{-B_i/T}$$

fejn A_i u B_i huma kostanti tar-rigressjoni mill-interċett u l-gradjent, rispettivament, tal-linji li joqogħdu l-ahjar iġġenerati mir-rigress lineari $\ln$ ki kontra r-reċiproku tat-temperatura assoluta f Kelvin (T). Bl-użu tar-relazzjonijiet ta' Arrhenius għall-idrolisi kkatalizzata aċida, newtrali u baži, il-kostanti tar-rata pseudo l-ewwel ordni, u għalhekk *half-lives* jistgħu jiġu kkalkolati għal temperaturi oħrajn li għalihom id-determinazzjoni diretta sperimentali tal-kostant tar-rata mhijiex prattikabbli (10).

2.2. L-EVALWAZZJONI U L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Il-parti l-kbira tar-reazzjonijiet ta' l-idrolisi jsegwu r-rati apparenti tar-reazzjonijiet ta' l-ewwel ordni u, għalhekk, il-*half-lives* huma indipendenti mill-koncentrazzjoni (ara l-ekwazzjoni 4 fl-Anness 2). Dan normalment jippermetti l-applikazzjoni tar-riżultati tal-laboratorju determinati bħala 10^{-2} sa 10^{-3} M għal kondizzjonijiet ambjentali ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Bosta eżempji ta' ftehim tajjeb bejn ir-rati ta' l-idrolisi mkejla f'ilmijiet kemm puri kif ukoll naturali għal varjetà ta' kimiċi ġew irrapportati minn Mabey u Mill (11), kemm-il darba kemm il-pH kif ukoll it-temperatura kienu tkejlu.

3. IR-RAPPORTAĠĠ

3.1. IR-RAPPORT TAT-TEST

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

Is-sustanza tat-test:

— isem komuni, isem tal-kimika, CAS numru, formula strutturali (li tindika l- pożizzjoni tat-tikketta meta jintuża materjal radjotikkettjat) u karatteristiċi rilevanti fiżiċi-kimiċi (ara t-taqsima 1.5);

— purità (impuritajiet) tas-sustanza tat-test;

— purità tat-tikketta ta' kimika ttikkettjata u attività molari (fejn xieraq).

▼B

- taħlitiet *buffer*;
- dati u dettalji tal-preparazzjoni
- *buffers* u ilmijiet użati;
- molarità u pH tat-taħlitiet *buffer*.

Il-kondizzjonijiet tat-test:

- id-dati tat-twettiq ta' l-istudji;
- l-ammont tas-sustanza tat-test applikati;
- il-metodu u s-solventi (tip u ammont) użati għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;
- il-volum tat-taħlitiet *buffered* tas-sustanza tat-test inkubati;
- deskrizzjoni tas-sistema ta' inkubazzjoni użata;
- pH u temperatura matul l-istudju;
- hinijiet tat-tehid tal-kampjuni;
- metodu/i ta' l-estrazzjoni;
- metodi biex jiġu kkwantifikati u identifikati s-sustanza tat-test u l-prodotti ta' l-idrolisi tagħha fit-taħlitiet *buffer*;
- għadd ta' replikati.

Riżultati:

- repetibbiltà u sensittività tal-metodi analitiċi użati;
- rkupru (valuri % għal studju validu jingħataw fit-taqsim 1.7.1);
- *data* replikata u mezzi f'forom tabulari;
- bilanċ tal-massa matul u fl-aħħar ta' l-istudji (meta tintuża sustanza tat-test ittikkettjata);
- riżultati tat-test preliminari;
- diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;
- id-*data* u l-figuri kollha oriġinali.

Din l-informazzjoni li ġejja hija mehtieġa biss meta hija ddeterminata r-rata ta' l-idrolisi:

- ippjanar fuq dijagramma ta' konċentrazzjonijiet kontra hin għas-sustanzi tat-testu, fejn xieraq, għall-prodotti ta' l-idrolisi għal kull valur ta' pH u temperatura;
- tabelli tar-riżultati ta' l-ekwazzjoni Arrhenius għat-temperatura 20 °C/25 °C, bil-pH, kostant tar-rata [h-1 jew jum-1], *half-life* jew DT50, temperaturi [°C] inklużi limiti tal-kunfidenza u l-koeffiċjenti tal-korrelazzjoni (r_2) jew informazzjoni komparabbli;
- rotta proposta ta' l-idrolisi.

▼B

4.

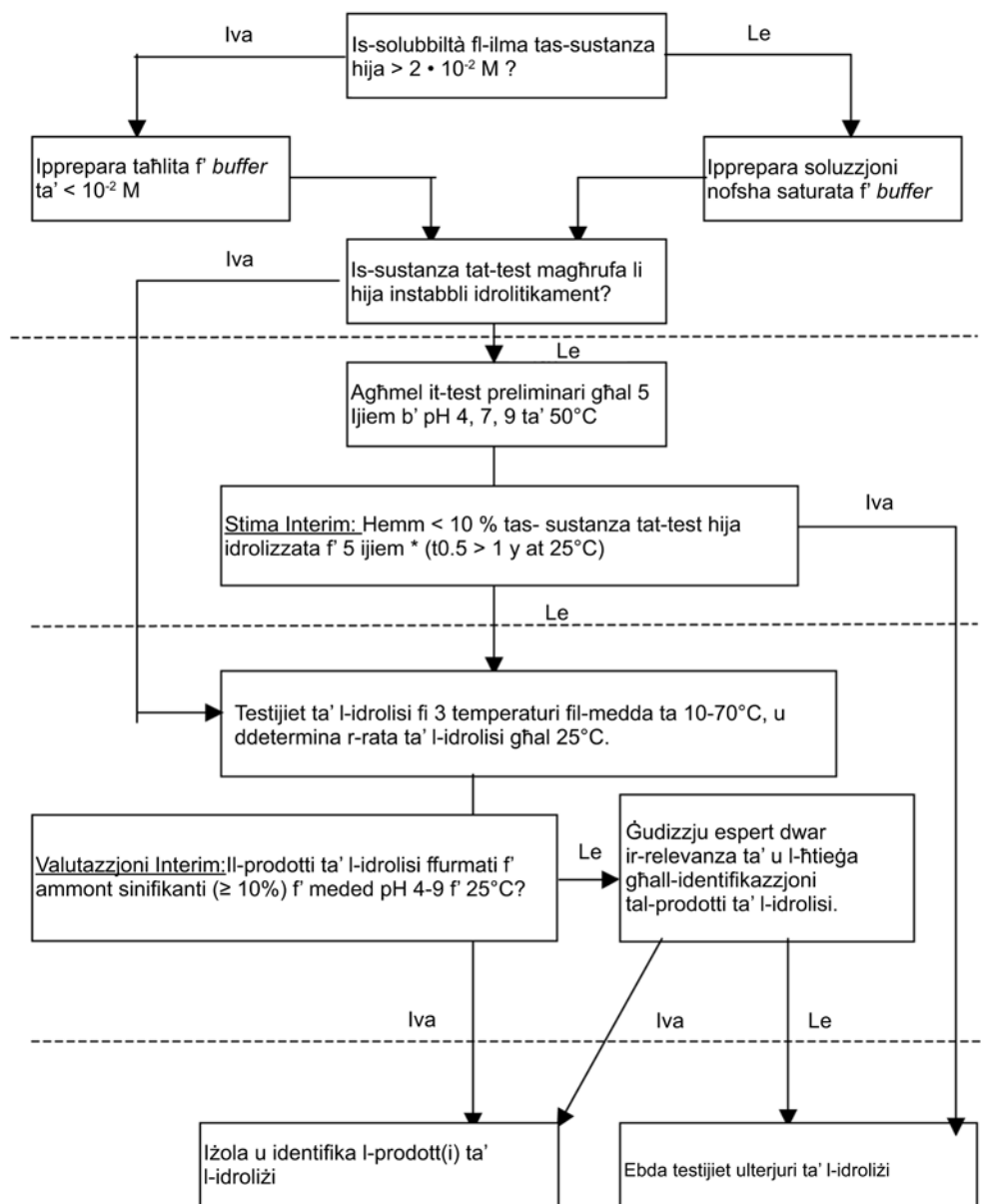
REFERENZI

- (1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.
- (2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.
- (5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).
- (7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.
- (9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).
- (11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.



ANNEX I

Tiered Hydrolysis Test Scheme



* 10% hydrolysis of a test substance at 50°C corresponds to a half-life of approx. 30 days which corresponds to a value of approx. 1 year at 20°C.

▼B

DT₅₀ (Disappearance Time(hin biex jisparixxi) 50): huwa l-hin li fih il-konċentrazzjoni tat-test titnaqqas b'50 %; huwa different mill-*half-life* $t_{0,5}$ meta r-reazzjoni ma ssegwix kinetiċi ta' l-ewwel ordni.

Stima ta' k f'temperatura differenti

Meta l-konstanti tar-rata huma magħrufa għal żewġ temperaturi, il-konstanti tar-rata f'temperaturi oħrajn jistgħu jiġu kkalkolati bl-użu ta' l-ekwazzjoni ta' Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ jew } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Tpingġija fid-djagramma ta' $\ln k$ versus $1/T$ tagħti linja dritta bi gradient ta' $-E/R$

Fejn

k = kostant tar-rata, imkejjejjel b'temperaturi differenti

E = enerġija ta' l-attivazzjoni [kJ/mol]

T = temperatura assoluta [K]

R = kostant tal-gass [8,314 J/mol.K]

L-enerġija ta' l-attivazzjoni giet ikkalkolata bl-analiżi tar-rigressjoni jew l-ekwazzjoni li ġejja:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

fejn: $T_2 > T_1$.

▼B*L-ANNESS 3***Sistemi Buffer****A. CLARK U LUBS:****Tahlitiet Buffer ta' CLARK u LUBS (*)**

Kompożizzjoni	pH
0,2 N HCl U 0,2 N KCl AT 20 °C	
47,5 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,0
32,25 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,2
20,75 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,4
13,15 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,6
8,3 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	1,8
5,3 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	2,0
3,35 ml. HCl + 25 ml. KCl mħal. sa 100 ml	2,2
0,1 M potassium biphthalate + 0,1 N HCl f'temperatura ta' 20 °C	
46,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,2
39,60 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,4
32,95 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,6
26,42 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	2,8
20,32 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,0
14,70 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,2
9,90 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,4
5,97 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	3,6
2,63 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. biphthalate to 100 ml	3,8
0,1 M potassium biphthalate + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 °C	
0,40 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,0
3,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,2
7,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,4
12,15 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,6
17,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	4,8

(*) Il-valur pH irrapportati f'dawn it-tabelli ġew ikkalkolati mill-kejl potenzjali bl-użu ta' ekwazzjonijiet standard ta' Sørensen (1909). Il-valuri pH korrispondenti huma 0,04 unitajiet oghla mill-valuri tabulate.

▼B

Kompożizzjoni	pH
23,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,0
29,95 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	5,2
35,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,4
39,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate to 100 ml	5,6
43,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	5,8
45,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biphthalate sa 100 ml	6,0

Tahlitiet *Buffer* ta' CLARK u LUBS (Ikompili)

0,1 M monopotassium phosphate + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 °C	
5,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,0
8,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,2
12,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,4
17,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,6
23,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	6,8
29,63 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,0
35,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,2
39,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,4
42,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,6
45,20 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	7,8
46,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfat sa 100 ml	8,0
0,1 M H₃B₃ in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 20 °C	
2,61 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	7,8
3,97 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,0
5,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,2
8,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,4
12,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,6
16,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	8,8
21,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,0
26,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,4
36,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,6
40,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	9,8
43,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. aċidu boriku sa 100 ml	10,0

B. KOLTHOFF U VLEESCHHOUWER:***Buffers taċ-ċitrat ta' KOLTHOFF u VLEESCHHOUWER***

Kompożizzjoni	pH
0,1 M ċitrat tal-monopotassju u 0,1 N HCl f'temperatura ta' 18 °C (*)	
49,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,2
43,4 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,4
36,8 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,6
30,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	2,8
23,6 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,0
17,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,2
10,7 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,4
4,2 ml. 0,1 N HCl + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,6
0,1 M ċitrat tal-monopotassju u 0,1 N NaOH f'temperatura ta' 18 °C (*)	
2,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	3,8
9,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,0
16,3 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,2
23,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,4
31,5 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,6
39,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	4,8
46,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,0
54,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,2
61,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,4
68,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,6
74,4 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	5,8
81,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. ċitrat sa 100 ml	6,0

(*) Żid kristall żgħir hafna ta' timol jew sustanza simili biex jitrazzan it-tkabbir tal-moffa.

▼B

C. SÖRENSEN:

Tahlitiet Borate ta' SÖRENSEN

Kompożizzjoni		Sörensen 18 °C	Walbun, pH f'temperatura ta'		
ml. Borax	ml. HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Tahlitiet tal-fosfat ta' SÖRENSEN

Kompożizzjoni	pH
0,0667 M Monopotassium phosphate + 0,0667 M Disodium phosphate f'temperatura ta' 20 °C	
99,2 ml. KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml. KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml. KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml. KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml. KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml. KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml. KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml. KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml. KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml. KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml. KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml. KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml. KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml. KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml. KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml. KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0



C.8. IT-TOSSICITÀ TAL-HNIEX

IT-TEST TAL-HAMRIJA ARTIFICJALI

1. IL-METODU

1.1. L-INTRODUZZJONI

F'dan it-test tal-laboratorju, is-sostanza tat-test hija miżjuda mal-hamrija artifiċjali li l-hniex ikunu mpoġġija fiha għal 14-il gurnata. Wara dan il-perjodu (u b'għażla wara sebat'ijiem) l-effett letali tas-sostanza fuq il-hniex hija eżaminata. It-test jipprovdi metodu għal superviżjoni relativvament għall-perjodu qasir ta' l-effett tal-kimiċi fuq il-hniex, bit-tehid tal-ġilda jew alimentari.

1.2. ID-DEFINIZZJONI U L-UNITÀ

LC₅₀: Il-konċentrazzjoni tas-sostanza stmata bħala li toqtol 50 % ta' l-annimali ttestjati waqt il-perjodu tat-test.

1.3. IS-SOSTANZA TAR-REFERENZA

Is-sostanza tar-referenza hija użata perjodikament bħala mezz ta' dimostrazzjoni li s-sensittività tas-sistema tat-test ma nbidlitx b'mod sinifikattiv.

Il-chloroacetamide analitiku tal-grad huwa rakkomandat bħala s-sostanza referenza.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

Il-hamrija hija mezz varjabbli, u għalhekk għal dan it-test il-hamrija artifiċjali tal-lom definita hija użata. Il-hniex adulti ta' l-ispeċi *Eisenia foetida* (ara n-nota fl-Appendiċi) huma miżmuma f'hamrija artifiċjali definita trattata b'konċentrazzjonijiet differenti tas-sostanzi tat-test. Il-kontenut tal-kontenituri huwa mifrux fuq gabarre 14-il gurnata (u b'għażla sebat'ijiem) wara l-bidu tat-test, u l-hniex li jibqgħu hajjin f'kull konċentrazzjoni jkunu magħduda.

1.5. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ

It-test huwa disinnjat biex ikun riproducibbli kemm jista' jkun fir-rigward tas-sustrat u l-organizmu tat-test. Il-mortalità fil-kontrolli m'għandhix taqbeż l-10 % fl-aħħar tat-test, jew inkella it-test ikun invalidu.

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. *Il-materjali*

1.6.1.1. Is-sustrata tat-test

Il-hamrija artifiċjali definita hija użata bħala substrat bażiku għat-test.

(a) Is-sustrata bażika (il-persentaġġi huma fit-termini tal-piż niexef)

— 10 % pit *Sphagnum* (kemm jista' jkun l-aktar qrib għall-pH 5,5 sa 6,0 bl-ebda fdalijiet tal-pjanti li jidhru u mithun fin),

▼B

- 20 % tafal tal-kawlina bi preferibbilment aktar minn 50 % kawlina,
- Madwar 69 % ramel tal-kwarz industrijali (ramel fin dominant b'aktar minn 50 % tal-qies tal-particelli ta' 0,05 sa 0,2mm). Jekk is-sostanza m'hijiex sufficjentement abbli li tinfirex fl-ilma, 10g għal kull kontenitur tat-test għandhom jinżammu disponibbli biex jithalltu mas-sostanza tat-test aktar tard, miż
- Madwar 1 % karbonat tal-kalċju (CaCO_3), fi trab, kimikament pur, żjud biex il-pH jingieb sa $6,0 \pm 0,5$.

(b) Is-substrata tat-test

Is-substrata tat-test ikun fiha is-substrata bażika, is-sostanza tat-test u l-ilma detonizzat.

Il-kontenut ta' l-ilma huwa ta' madwar 25 sa 42 % tal-piż niexef tas-substrata bażika. Il-kontenut ta' l-ilma tas-substrata huwa determinat billi jkun imnixxef kampjun għall-piż kostanti ta' 105 °C. Il-kriterju prinċipali huwa li l-hamrija artifiċjali għandha tkun imxarra sal-punt fejn m'hemm l-ebda ilma qiegħed. Għandu jkun hemm attenzjoni meta' jkun qed isir it-tahlit biex tkun miksuba distribuzzjoni uguali tas-sostanza tat-test u tas-substrata. Il-mod ta' kif tkun introdotta is-sostanza tat-test mas-substrata għandu jkun rappurtat.

(ċ) Is-substrata tal-kontroll

Is-substrata tal-kontroll fiha is-substrata bażika u l-ilma. Jekk aġent addittiv ikun użat, il-kontroll addizzjonali għandu jkun fih l-istess kwantità ta' l-aġent addittiv.

1.6.1.2. Il-kontenituri ta' l-ittestjar

Il-kontenituri tal-ħgieg ta' madwar litru kapacià (adegwatament miksija bl-ghatien tal-plastik, id-dixxijiet jew l-film tal-plastic bit-toqob għall-ventilazzjoni) mimlija b'ammont tas-substrata mxarra tat-test jew tal-kontroll ekwivalenti għall-500g tal-piż niexef tas-substrata.

1.6.2. Il-kondizzjonijiet tat-test

Il-kontenituri għandhom jinżammu fi kmamar klimatiċi f'temperatura ta' 20 ± 2 °C bid-dawl kontinwu. L-intensità tad-dawl għandha tkun ta' 400 sa 800 lux.

Il-perjodu tat-test huwa ta' 14-il ġurnata, iżda l-mortalità tista' tkun stmata b'għażla ta' sebat'ijiem wara li jibda t-test

1.6.3. Il-proċedura tat-test**Il-konċentrazzjonijiet tat-test**

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza tat-test huma esprese bħala piż tas-sostanza għall-piż niexef tas-substrata bażika (mg/kg).

It-test biex jinstabu l-limiti

Il-limiti tal-konċentrazzjonijiet li jikkawża mortalità ta' 0 sa 100 % biss jistgħu jkunu determinati f'test biex jinstabu l-limiti biex tkun provvduta l-informazzjoni fuq il-limiti tal-konċentrazzjonijiet li għandhom jintużaw fit-test definittiv.

▼B

Is-sostanza għandha tkun ittestjata fil-konċentrazzjonijiet li ġejjin: 1 000; 100; 10; 1; 0,1mg tas-sostanza/kilogramma tas-substrata tat-test (il-piż niexef).

Jekk it-test shiħ definittiv għandu jkun magħmul, grupp wiehed għal kull konċentrazzjoni u wiehed għall-kontroll mhux trattat, kull wiehed b'għaxar hniex, għandu jkun suffiċjenti għat-test biex jinstabu l-limiti.

It-test definittiv

Ir-riżultati għat-test biex jinstabu l-limiti huma wżati biex jintgħazlu minn ta' l-anqas hames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika li tilhaq eżatt il-limiti ta' bejn 0 sa 100 % tal-mortalità u li tinbidel b'fattur kostanti li ma jaqbizx il-1,8.

It-testijiet li jużaw din is-serje ta' konċentrazzjoni għandhom iħallu l-valur LC_{50} u l-limiti tiegħu ta' kunfidenza biex ikunu stmati kemm jista' jkun b'mod preċiż.

Fit-test definittiv minn ta' l-anqas erba' gruppi tat-testijiet għal kull konċentrazzjoni u erba' kontrolli mhux trattati, kull wiehed b'10 hniex, huma wżati. Ir-riżultati ta' dawn il-gruppi repliki huma mogħtija bħala devjazzjoni medja u standard.

Meta' żewġ konċentrazzjonijiet konsekuttivi, b'rata ta' 1,8, jagħtu biss 0 u 100 % mortalità, dawn iż-żewġ valuri huma suffiċjenti biex jindikaw il-limiti li fihom jaq' l- LC_{50} .

It-taħlita tas-substrata bażika tat-test u s-sostanza tat-test

Is-substrata tat-test għandha, kull meta' jkun possibbli, tkun magħmula mingħajr ebda aġenti addizzjonali minbarra l-ilma. Immedjatement qabel il-bidu tat-test, l-emulsjoni jew it-tixrid tas-sostanza tat-test filma mingħajr jonji jew f'xi solvent ieħor tiġi mħallta mas-substrata bażika tat-test, jew sprejjet b'mod ugwali fuqha bi sprej fin kromotagrafiku jew ieħor simili.

Jekk ma tkunx tinħall fl-ilma, is-sostanza tat-test tista' tkun mahlula f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku adattat (eż. hexane (idrokarbon likwidu), aċeton jew kloroform).

Dawk l-aġenti biss li jtiru malajr jistgħu jkunu wżati biex ikunu iħollu, jferrxu jew jemulsifaw is-sostanza tat-test. Is-substrata tat-test għandha tkun ventilata qabel l-użu. L-ammont ta' ilma evaporat għandu jkun sostitwit. Il-kontroll għandu jkollu l-istess kwantità ta' kwalunkwe aġenti addittivi.

Jekk is-sostanza tat-test ma tkunx solubbli, li tista' tinfirex jew li tista' tkun emulsifata fis-solventi organiċi, 10g tat-taħlita tar-ramel miħun fin tal-kwarz u kwantità tas-sostanza tat-test neċessarja biex titratta 500g piż niexef tal-hamrija artifiċjali huma mħallta ma 490g tal-piż niexef tas-substrata tat-test.

Għall kull grupp tat-test, ammont tas-substrata tat-test imxarrba ekwivalenti għal 500g piż niexef tiġi mpoġġija f'kull kontenitur tal-ħġieġ u 10 hniex, li kienu kkondizzjonati għal 24 siegħa f'substrata simili mxarrba u mbaġħad maħsula malajr u l-ilma żejjed mixrub fuq karta li tiffiltra qabel l-użu, huma mpoġġija fuq il-wiċċ tas-substrata tat-test.

▼B

Il-kontenituri huma mgħottija bl-ghatien tal-plastic imtaqqba, bid-dixxijiet jew bil-film biex ikun evitat li s-substrata tinxf u dawn huma miżmumin taht il-kondizzjonijiet tat-test għal 14-il ġurnata.

L-istimi għandhom ikunu magħmula 14-il-ġurnata (u b'għażla seba' t'ijiem) wara li jkun magħmul it-test. Is-substrata tiġi mifruxa fuq platt magħmul mill-ħġieġ jew ta' l-azzar li ma jissaddadx. Il-ħniex jiġu eżaminati u n-numru tal-ħniex li għexu għandu jkun determinat. Il-ħniex huma kkonsidrati mejta jekk dawn ma jirrispondux għal stimulu ġentili u mekkaniku mat-tarf ta' quddiem.

Meta' l-eżaminazzjoni tkun magħmula fis-seba' ġurnata, il-kontenitur għandu jerġa' jimtela bis-substrata u l-ħniex li għex għandu jkun sostitwit fuq l-istess wiċċ tas-substrata tat-test.

1.6.4. *L-organizmi tat-test*

L-organizmi tat-test għandhom ikunu adulti ta' l-*Eisenia foetida* (ara n-nota fl-Appendiċi) (minn ta' l-anqas ta' żmien xahrejn bil-clitellum) tal-piż imxarrab ta' 300 sa 600 mg. (Għall-metodu tat-tgħammir ara l-Appendiċi).

2. **ID-DATA**

2.1. **IT-TRATTAMENT U L-VALUTAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

Il-konċentrazzjonijiet tas-sostanza ttestjata huma rappurtati bir-referenza għall-persentaġġi korrispondenti tal-ħniex mejta.

Meta' d-data tkun adegwata il-valur ta' l- LC_{50} u l-limiti tal-kunfidenza ($p = 0,05$) għandhom ikunu determinati billi jintużaw il-metodi standard (Litchfield u Wilcoxon, 1949, għall-metodu ekwi-valenti). L- LC_{50} għandu jkun mogħti bhala mg tas-sostanza tat-test għal kull kilogramma tas-substrata tat-test (piż niexef).

F'dawk il-każijiet meta' it-tidwira tal-kurva tal-konċentrazzjoni hija wisq wieqfa biex tippermetti l-kalkulazzjoni ta' l- LC_{50} , stima grafika ta' dan il-valur hija suffiċjenti.

Meta' żewġ konċentrazzjonijiet bhala rata ta' 1,8 jagħtu biss 0 % u 100 % mortalità, iż-żewġ valuri huma suffiċjenti biex jindikaw il-limiti li fihom jaqa' l- LC_{50} .

3. **IR-RAPPORTAĠĠ**

3.1. **IR-RAPPORT TAT-TEST**

Ir-rapport tat-test jekk possibbli, għandu, jkun fih dan li ġej:

- id-dikjarazzjoni li t-test kien magħmul skond il-kriterji tal-kwalità msemmija aktar 'il fuq,
- it-test magħmul (it-test li jsib il-limiti u/jew it-test definittiv),
- id-deskrizzjoni eżatta tal-kondizzjonijiet tat-test jew id-dikjarazzjoni li t-test kien magħmul skond il-metodu; kwalunkwe devjazzjonijiet għandhom ikunu rappurtati,
- id-deskrizzjoni eżatta ta' kif is-sostanza tat-test tiġi mhallta mas-substrata bażika tat-test,
- l-informazzjoni dwar l-organizmi tat-test (l-ispeċi, iż-żmien, il-medja u l-limiti tal-piż, il-kondizzjonijiet taż-żamma u n-nifs, il-fornitur),

▼B

- il-metodu użat għad-determinazzjoni ta' l- LC_{50} ,
- ir-riżultati tat-test inkluża d-data kollha użata,
- id-deskrizzjoni tas-sintomi jew il-bidliet osservati fl-aġir ta' l-organismi tat-test,
- il-mortalità fil-kontrolli,
- l- LC_{50} jew il-konċentrazzjoni l-aktar għolja ttestjata minghajr il-mortalità u l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa b'mortalità ta' 100 %, 14-il ġurnata (u b'għażla ta' seba' t'ijiem) wara li jkun mibdi t-test,
- it-tpiġġja tal-kurva tal-konċentrazzjoni/respons,
- ir-riżultati miksuba bis-sustanza tar-referenza, kemm jekk bl-assocjazzjoni mat-test preżenti jew mill-eżerċizzji ta' qabel tal-kontroll tal-kwalità.

4. **REFERENZI**

- (1) OECD, Pariġi, 1981, Test Guideline 207, id-Deċizzjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.
- (2) Edwards, C.A. and Lofty, J.R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, Londra, 331pp.
- (3) Bouche, M.B., 1972, Lombriciens de France, Écologie et Systématique, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. J.Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.
- (5) Il-Kummissjoni tal-Kommunitajiet Ewropej, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Rapport EUR 8714 EN, 1983.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag "Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetidia in kunstlichem Boden", f: Rudolph/Boje, Okotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.



Appendiċi

It-tgħammir u ż-żamma tal-hniex qabel l-ittestjar

Biex jitgħammru l-annimali, 30 sa 50 ħanex adult, jitpoġġew f'kaxxa tat-tgħammir bis-substrata friska u mnehhija wara 14-il ġurnata. Dawn l-annimali jistgħu jkunu wżati għal gruppi ohra tat-tgħammir. Il-hniex imfaqqsa mill-fosdqa huma wżati għall-ittestjar meta' jkunu maturi (taht il-kondizzjonijiet preskritti wara xahrejn jew tlett xhur).

Il-kondizzjonijiet taż-żamma u tat-tgħammir

Il-kamra klimatika: it-temperatura ta' 20 ± 2 °C preferibbilment bid-dawl kontinwu (intensita' ta' 400 sa 800 lux).

Il-kaxxa tat-tgħammir: il-kontenituri baxxi adattati tal-volum ta' 10 sa 20 l.

Is-substrata: L-*Eisenia foetida* tista' titrabba fl-eskrimenti ta' annimali varji. Huwa rakkomandat li bħala mezz tat-tgħammir tintuża taħlita ta' 50 % mill-volum pit u 50 % demel tal-baqar jew taż-żwiemel. Il-mezz għandu jkollu valur tal-pH ta' madwar 6 sa 7 (refolat bil-karbonju tal-kalċju) u konduttività tal-jonje baxxa (anqas minn 6 mmhos jew 0,5 % konċentrazzjoni tal-melħ).

Is-substrata għandha tkun niedja iżda mhux imxarrba żżejjed.

Il-proċeduri l-ohra ta' suċċess jistgħu jkunu wżati minbarra l-metodu mogħti hawn fuq.

Nota: L-*Eisenia foetida* teżisti f'żewġ razzi li ċerti tassonomi sseparaw fi speċi (Bouche, 1972). Dawn huma morfologikament simili minnbarra waħda, *Eisenia foetida foetida*, li għandha strixxi tipikament transversali jew faxxi fuq is-segmenti u l-ohra, *Eisenia foetida andrei*, li m'għandix dan u għandha kulur aħmar varjegat. Fejn hu possibbli l-*Eisenia foetida andrei* għandha tintuża. L-ispeċi l-ohra jistgħu jkunu wżati jekk il-metodologija neċessarja hija disponibbli.



C.9. ID-DEGREDAZZJONI BIJOLOĠIKA

IT TEST TA' WELLENS –ZAHN

1. IL-METODU

1.1. L-INTRODUZZJONI

Ir-raġuni tal-metodu hija l-valutazzjoni ta' bijodegradabilità potenzjali u aħharja tas-sostanzi li jinhallu fl-ilma, li mhumex volatili u organiċi meta' dawn ikunu esposti għall-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin ta' mikroorganizmi f'test statiku.

L-assorbiment fizikokimiku fuq is-solidi sospizi jista' jsir u dan għandu jittiehed in konsiderazzjoni meta' jkun qegħdin jiġu interpretati r-riżultati (ara 3.2).

Is-sostanzi li għandhom ikunu studjati huma wżati f'konċentrazzjonijiet li jikkorrispondu għall-valuri DOC fil-limiti ta' 50 sa 400 mg/litru jew il-valuri COD fil-limiti ta' 100 sa 1 000 mg/litru (DOC = il-karbonju organiku mahlul; COD = id-domanda għall-ossigenu kimiku). Dawn il-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin għandhom il-vantaġġ li huma affidabbli b'mod analitiku. Il-komposti bil-proprietajiet tossiċi jistgħu itawwlu jew iwaqqfu il-proċess ta' degradazzjoni.

F'dan il-metodu, il-kejl tal-konċentrazzjoni tal-karboju organiku mahlul jew id-domanda għall-ossigenu kimiku huwa wżat biex jistima il-bijodegradabilità aħharja tas-sostanza tat-test.

L-użu simultanju tal-metodu speċifiku analitiku jista' jippermetti l-istimar tal-bijodegradazzjoni primarja tas-sostanza (it-tneħħija ta' l-istruttura kimika maġġuri).

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk is-sostanzi organiċi tat-test li, fil-konċentrazzjoni użata fit-test:

- huma solubbli fl-ilma taht il-kondizzjonijiet tat-test,
- għandhom pressjoni tal-fwar insinjifikanti taht il-kondizzjonijiet tat-test,
- li mhumex inibitorji għall-batterji,
- li huma mixruba fis-sistema tat-test biss sa' ċertu limitu,
- li mhumex mitlufa fir-rawha mis-soluzzjoni tat-test.

L-informazzjoni fuq il-proporzjoni relattivi tal-komponenti maġġuri tal-materjal tat-test għandu jkun utli biex ikunu interpretati r-riżultati miksuba, partikolarment f' dawk il-każijiet fejn ir-riżultati huma baxxi jew marginali.

L-informazzjoni fuq it-toxicità tas-sostanza għall-mikro-organizmi hija mixtieqa għall-interpretazzjoni tar-riżultati baxxi u fl-għażla tal-konċentrazzjoni adattati tat-test.

▼B

1.2. ID-DEFINIZZJONIJIET U L-UNITAJIET

L-ammont ta' degradazzjoni miksuba fl-ahhar tat-test hija rappurtata bhala "Il-bijodegradabilità fiz-Zahn – it-test ta' Wellens":

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{C_T - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \times 100$$

fejn:

DT = id-degradazzjoni bijoloġika (%) fil-hin T,

CA = DOC (jew COD) valuri fit-tahlita tat-test imkejla tlett siegħat wara l-bidu tat-test (mg/l) (DOC = Il-Karbonju Organiku Mahlul, COD = Id-domanda għall-Ossigenu Kimiku),

CT = il-valuri DOC jew COD fit-tahlita tat-test fil-hin tat-tehid tal-kampjun (mg/l),

CB = il-valuri DOC jew COD tal-vojt fil-hin tat-tehid tal-kampjun (mg/l),

CBA = il-valuri DOC jew COD tal-vojt, mkejla tlett siegħat wara l-bidu tat-test (mg/l).

Il-limitu tad-degradazzjoni huwa miżjud għall-eqreb persentaġġ shih.

Il-persentaġġ tad-degradazzjoni huwa dikjarat bhala l-persentaġġ DOC (jew COD) ta' tnehhija tas-sostanza ttestjata.

Id-differenza bejn il-valur imkejjel wara tlett siegħat u l-valur inizjali kkalkulat jew preferibbilment imkejjel jista' jipprovi informazzjoni utli fuq l-eliminazzjoni tas-sostanza (ara 3.2, L-interpretazzjoni tar-risultati).

1.3. IS-SOSTANZI TAR-REFERENZA

F'ċerti każijiet meta' jkunu qegħdin jiġu investigati sostanzi ġodda s-sostanzi tar-referenza jistgħu jkunu utli; madanakollu, s-sostanzi speċifiċi tar-referenza ma jistgħux ikunu rakkomandati.

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

It-tajn ohxon attiv, in-nutrijenti minerali u l-materjali ta' l-ittestjar bhala l-unika sors tal-karbonju f'soluzzjoni mimlija ilma huma mpoġġija flimkien f'reċipjent tal-ħġieġ li jiehu minn litru sa erba' litri mghammar b'aġitatur u b'apparat li jagħti l-arja. It-tahlita tiġi aġitata u mogħtija l-arja f 20 to 25 °C taħt l-illuminazzjoni mferrxa jew f'kamra mudlama sa 28 għurnata. Il-proċess ta' degradazzjoni jiġi kkontrollat bid-determinazzjoni tal-valuri tad-DOC (jew is-COD) fis-soluzzjoni f'filtrata f'intervalli ta' kuljum jew f'intervalli ohra tal-hin adattati. Ir-rata tad-DOC (jew COD) eliminati wara kull intervall għall-valur tlett siegħat wara l-bidu hija espressa bhala persentaġġ ta' bijodegradazzjoni u sservi bhala kejl tal-limitu ta' degradazzjoni f'dan il-hin. Ir-risultat ikun impingħi versus il-hin biex jagħti l-kurva tal-bijodegradazzjoni.

Meta' l-metodu speċifiku analitiku jkun użat, it-tibdiliet fil-konċentrazzjoni tal-molekula maġġuri minhabba d-degradazzjoni tista' tkun imkejla (bijodegradabilità primarja).

▼B

1.5. IL-KRITERJI TAL-KWALITÀ

Ir-riproducibilità ta' dan it-test ġie pruvat li hi sodisfaċenti f'test ċirku.

Is-sensittività tal-metodu hija determinata l-aktar mill-varjabilità tal-vojt u, anqas, mill-preċiżjoni tad-determinazzjoni tal-karbonju organiku mahlul u l-livell tal-kompost tal-likur tat-test.

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-PROCEDURA TAT-TEST

1.6.1. *Il-preparazzjonijiet*1.6.1.1. *Ir-reagenti*

L-ilma tat-test: l-ilma tax-xorb bil-kontenut tal-karbonju organiku < 5mg/litru. Il-konċentrazzjoni tal-jonji tal-kalċju u tal-manjesju flimkien ma jistgħux jaqbu il-2,7 mmole/litru; jew inkella it-taħlit adegwat ma' l-ilma dejonizzat jew distillat huwa meħtieġ.

L-aċidu sulfuriku, ir-reagent analitiku (A.R.): 50 g/l

Is-soluzzjoni ta' l-idrossidu tas-sodju A.R.: 40 g/l

Is-soluzzjoni nutrijenti tal-minerali: holl f'litru ilma dejonizzat:

Il-klorit ta' l-ammonja, NH_4Cl , A.R.: 38,5 g

Dihydrogenphosphate tas-sodju, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, A.R.: 33,4 g

Dihydrogenphosphate tal-potassju, KH_2PO_4 , A.R.: 8,5 g

di-potassium mono-hydrogenphosphate, K_2HPO_4 , A.R.: 21,75 g.

It-taħlita sservi kemm bħala nutrijent u kemm bħala sistema ta' *buffering*.

1.6.1.2. *L - a p p a r a t*

Ir-reċipjenti tal-ħġieġ b'volum ta' litru sa erba' litri (e.ż. ir-reċipjenti ċilindriċi).

L-aġitatur bi strument li jhallat tal-ħġieġ jew tal-metall fuq maqbad adattat (l-istrument li jhallat għandu jdur madwar 5 sa 10 cm fuq il-qiegħ tar-reċipjent). L-istrument li jhallat u li hu manjetiku b' lasta twila minn 7 sa 10 cm tista' tkun użata minflok.

It-tubu tal-ħġieġ ta' 2 sa 4 mm fid-dijametru ta' ġewwa biex tkun introdotta l-arja. Il-ftuħ tat-tubu għandu jkun ta' madwar 1 cm fuq il-qiegħ tar-reċipjent.

ċentrifugu (madwar 3 550 g).

Il-metru tal-pH.

Il-metru ta' l-ossigenu mahlul.

Il-filtri tal-karta.

▼B

L-apparat tal-filtrazzjoni tal-membran.

Il-filtri tal-membra, il-qies tal-pora ta' 0,45 nm. Il-filtri tal-membran huma adattati jekk huwa żgurat li huma la jerġu l-karbonju u lanqas jassorbu s-sostanza fl-istadju tal-filtrazzjoni.

It-tagħmir analitiku għad-determinazzjoni tal-kontenut tal-karbonju u tad-domanda ta' l-ossigenu kimiku.

1.6.1.3. Il-preparazzjoni tas-sostanza tat-tilqim

It-tajn ohxon attiv minn pjanta tat-trattament bijoloġiku jiġi maħsul minn (b'mod repetitiv) ċentrifugazzjoni jew tqeghed bl-ilma tat-test (fuq).

It-tajn ohxon attiv għandu jkun f'kondizzjoni adattata. Dan it-tajn huwa disponibbli minn pjanta tat-trattament ta' l-ilma li huwa skart li taħdem tajjeb. Biex jingabu kemm jista' jkun speċji u razzez differenti ta' batterji, jista' jkun aħjar li tithallat is-sostanza tat-tilqim minn sorsi differenti (e.ż. il-pjanti tat-trattament differenti, l-estratti tal-hamrija, l-ilma tax-xmara, eċċ.). It-tahlita għandha tkun trattata kif deskritt hawn fuq.

Biex tkun iċċekkjata l-attività tat-tajn ohxon attiv ara “Il-kontroll funzjonali”, taħt.

1.6.1.4. Il-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test

Żied mar-riċipjent tat-test 500ml ta' l-ilma tat-test, 2,5 ml/litru tas-soluzzjoni nutrijenti u t-tajn ohxon attiv f'ammont li jikkorrispondi għal 0,2 sa 1,0 g/litru ta' materjal niexef fit-tahlita finali. Żied soluzzjoni ta' l-istokk suffiċjenti tas-sostanza li għandha tkun ittestjata biex b'hekk il-konċentrazzjoni DOC ta' 50 sa 400mg/litru tirriżulta fit-tahlita finali. Il-valuri tas-COD korrispondenti huma 100 sa 1 000 mg/litru. Għamel bl-ilma tat-test għall-volum totali ta' litru sa erba' litri. Il-volum totali li għandu jintgħażel huwa dipendenti fuq in-numru ta' kampjuni li għandhom jittiehdu għad-determinazzjoni tad-DOC jew tas-COD u l-volumi neċessarji għall-proċedura analitika.

Normalment il-volum ta' żewġ litri jista' jitqies bħala sodisfaċenti. Minn ta' l-anqas riċipjent wieħed tal-kontroll (vojt) huwa magħmul biex jimxi parallel ma' kull serje tat-test; huwa fih biss tajn ohxon attiv u s-soluzzjoni tan-nutrijenti minerali magħmul bl-ilma tat-test għall-istess volum totali bħal fir-riċipjenti tat-test.

1.6.2. L-andament tat-test

Ir-riċipjenti tat-test jiġu aġitati bl-istrumenti li jhalltu li huma manjetiċi jew skrejjen li jinbuttaw taħt illuminazzjoni mxerrda jew f'kamra mdallma f'20 sa 25 °C. L-ghoti ta' l-arja huwa miksub bl-arja kompressata mnaddfa b'passatur tas-suf tal-qoton u bi flixkun tal-ħasil jekk ikun neċessarju. Għandu jkun żgurat li t-tajn ohxon ma joqgħodx u l-konċentrazzjoni ta' l-ossigenu ma taqax taħt iż-2mg/litru.

Il-valur pH għandu jkun iċċekkjat f'intervalli regolari (e.ż. kuljum) u irrangat għal pH 7 sa 8, jekk ikun neċessarju.

▼B

It-telf mill-evaporazzjoni huwa magħmul eżatt qabel kull tehid tal-kampjun bl-ilma dejonizzat jew distillat fl-ammonti mehtieġa. Il-proċedura tajba għandha timmarka l-livell tal-likwidu fuq ir-reċipjent qabel ma jibda t-test. Il-marki l-godda huma magħmula wara kull tehid ta' kampjun (minghajr l-ghoti ta' l-arja u t-tahwid). L-ewwel kampjuni huma dejjem meħuda tlett siegħat wara l-bidu tat-test biex b'hekk ikun skopert l-assorbiment tal-materjali tat-test bit-tajn ohxon attivat.

L-eliminazzjoni tal-materjal tat-test huwa segwit bid-determinazzjoni tad-DOC jew tas-COD magħmula kuljum jew f'intervall iehor regolari. Il-kampjuni mir-reċipjenti tat-test u l-vojt huma ffiltrati minn ġo filtru tal-karti mahsul sew. L-ewwel 5ml tas-soluzzjoni filtrata tat-test huma mormija. It-tajn ohxon li huwa diffiċli li tiffiltrah jista' jkun imneħhi qabel biċ-ċentrifugazzjoni għal 10 minuti. Id-determinazzjonijiet tad-DOC u s-COD huma magħmul doppji. It-test huwa magħmul sa 28 ġurnata.

Nota: Il-kampjuni li jibqgħu turpid jiġu ffiltrati minn ġo filtri tal-membran. Il-filtri tal-membran m'għandhom jerhu jew jassorbu xi materjal organiku.

Il-kontroll funzjonali tat-tajn ohxon attivati

Ir-reċipjent li fih sostanza magħrufa għandu jkun magħmul parallel ma' kull serje ta' testijiet biex b'hekk tkun iċċekkjata l-kapaċità funzjonali tat-tajn ohxon attivati. Id-diethyleneglycol kien misjub utli għal dan il-ghan.

L - a d a t t a m e n t

Jekk l-analiżi huma magħmula f'intervalli relattivament qosra (e.ż. kuljum), l-adattament għandu jkun rikonoxxut b'mod ċar mill-kurva tad-degradazzjoni (ara l-Figura 2). It-test għalhekk m'għandux jibda immedjatament qabel il-weekend.

Jekk l-adattament isehh fl-aħħar tal-perjodu, it-test jista' jittawwal sakemm id-degradazzjoni tkun kompleta.

Nota: Jekk tagħrif aktar vast fuq l-aġir tat-tajn ohxon huwa mehtieġ, l-istess tajn ohxon attivati huwa espost darba ohra għall-istess materjal tat-test skond il-proċedura li ġejja:

Itfi l-aġitatur u l-apparat li jagħti l-arja u halli t-tajn ohxon attivati joqgħod. Nehhi s-sustanza li tghum f'wiċċ il-likwidu, imla sa żewġ litri bl-ilma tat-test, hawwad għal 15-il minuta u hallih jerga joqgħod. Wara li s-sustanza li tghum f'wiċċ il-likwidu tkun imneħhija, uża t-tajn ohxon li jibqa biex tirrepeti t-test bl-istess materjal skond 1.6.1.4 u 1.6.2, fuq. It-tajn ohxon attivati jista' wkoll ikun iżolat biċ-ċentrifugazzjoni minfloq bit-tqeghid.

It-tajn ohxon attivati jista' jkun imhallat mat-tajn ohxon frisk għal konċentrazzjoni ta' 0,2 sa 1 g piż niexef/litru.

▼B**Il-mezzi analitiċi**

Normalment il-kampjuni jiġu ffiltrati minn ġo passatur tal-karti mahsul sew (għal hasil uża l-ilma deonizzat).

Il-kampjuni li jibqgħu mdardra jiġu ffiltrati minn ġo filtri tal-membran (0,45 µm).

Il-konċentrazzjoni DOC hija determinata darbtejn fil-filtrati tal-kampjuni (l-ewwel 5ml jiġu mormija) permezz ta' l-istrument tat-TOC. Jekk il-filtrat ma jistax ikun analizzat fl-istess ġurnata, għandu jkun merfugħ fir-refriġeratur sal-ġurnata ta' wara. Irfiġh għal aktar tul ta' żmien ma jistax ikun rakkomandat.

Il-konċentrazzjoni COD hija determinata fil-filtrati tal-kampjuni b'arrangatura analitika tas-COD bil-proċedura deskritta fir-referenza (2), hawn taht.

2. **ID-DATA UL-VALUTAZZJONI**

Il-konċentrazzjoni tad-DOC u/jew tas-COD huma determinati minn ta' l-anqas darbtejn fil-kampjuni skond 1.6.2 hawn fuq. Id-degradazzjoni fil-hin T hija kkalkulata skond il-formula (bid-definizzjonijiet) mogħtija taht 1.2 hawn fuq.

Il-limitu tad-degradazzjoni jiġi mnaqqas jew miżjud għall persentaġġ shih l-aktar qrib. L-ammont tad-degradazzjoni miksub fl-aħħar tat-test huwa rappurtat bħala il-“Biodegradabilità fiz-Zahn – it-test ta' Wellens”.

Nota: Jekk id-degradazzjoni kompleta hija miksuba qabel il-hin tat-test jispiċċa u dan ir-riżultat huwa konfermat b'analizi oħra fil-ġurnata ta' wara, it-test jista' jkun konkluz.

3. **IR-RAPPORTAGG**

3.1. **IR-RAPPORT TAT-TEST**

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, ikun fih dan li ġej:

- il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza,
- l-informazzjoni l-oħra kollha u r-riżultati sperimentali rigward is-sustanza ttestjata, is-sostanza referenza jekk kienet uzata, u l-vojt,
- il-konċentrazzjoni wara tlett siegħat,
- il-kurva tal-biodegradazzjoni bid-deskrizzjoni,
- id-data u l-post fejn l-organizmi tat-test kienu meħuda, l-istatus ta' l-adattament, il-konċentrazzjoni uzata, eċċ.,
- ir-raġunijiet xjentifiċi għal kwalunkwe tibdiliet fil-proċedura tat-test.

3.2. **L-INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

It-tnehhija tad-DOC (COD) li ssir gradwalment fuq medda ta' granet jew ġimghat tindika li s-sustanza tat-test qiegħda tiġi biodegradata.

▼B

Madanakollu, l-assorbiment fiziko-kimiku jista', f'ċerti kazijiet, jilgħab rwol u dan huwa indikat fejn hemm it-tnehhija kompleta jew parzjali mill-bidu nett, fl-ewwel tlett siegħat, u d-differenza bejn il-likuri tal-kontroll u dawk li jgħumu f'wiċċ l-ilma tibqa f'livell baxx li ma jkunx mistenni.

Aktar testijiet huma neċessarji jekk għandu jkun hemm distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew il-biodegradazzjoni parzjali) u l-assorbiment.

Dan jista' jkun magħmul f'numru ta' modi, iżda dak l-aktar konvinċenti għandu jkun li tkun użata is-sustanza li tghum f'wiċċ l-ilma jew it-tajn oħxon bħala sustanza użata għat-tilqim f'test tas-sett bażiku (preferibbilment f'test respirometrik).

Is-sustanzi tat-test li jagħtu tnehhija għolja u li ma tassorbix ta' DOC (COD) fittest għandhom ikunu meqjusa bħala potenzjalment biodegradabbli. It-tnehhija parzjali li ma tassorbix tindika li l-kimika hija minn ta' l-anqas sogġetta għal ċerta biodegradazzjoni. It-tnehhija baxxa jew l-ebda tnehhija tad-DOC (COD) tista' tkun kawża ta' l-inibizzjoni tal-mikroorganizmi mis-sostanza tat-test u dan jista' wkoll ikun mikxuf bil-lisi u t-telf tat-tajn oħxon, li jagħti sostanzi li jgħumu fuq l-ilma li jkunu mdardra. Dan it-test għandu jkun ripetut billi tintuza konċentrazzjoni aktar baxxa tas-sostanza tat-test.

L-użu tal-metodu speċifiku għall-komposti jew tas-sostanza tat-test bit-tikketta 14 C tista' thalli sensitività aktar għolja. Fil-każ tal-kompost tas-14C tat-test, l-irkuprar tal-14 CO₂ għandu jikkonferma li l-biodegradazzjoni seħħet.

Meta r-rizultati jingħataw fit-termini tal-bijodegradazzjoni primarja, għandha tingħata spjegazzjoni jekk ikun possibbli fuq il-bidla ta' l-istruttura kimika li twassal għal telf fir-rispons tas-sustanza tat-test primarja.

The validation of the analytical method must be given together with the response found on the blank test medium.

4. **IR-REFERENZI**

- (1) OECD, Parigi, 1981, Test Guideline 302 B, Id-Deciżjoni tal-Kunsill C (81) 30 finali.
- (2) L-Anness V C.9 Id-Degradazzjoni: Id-Domanda għall-Ossigenu Kimiku, id-Direttiva tal-Kummissjoni 84/449/KEE, Il-Gurnal Uffiċjali tal-Komunitajiet Ewropej, Nru L 251, 19.9.1984.



L-Appendici:

L-EŻEMPJU TAL-VALUTAZZJONI

Il-kompost organiku:	L-aċidu 4-Ethoxybenzoic
Il-konċentrazzjoni teoretika tat-test:	600 mg/l
Id-DOC teoretiku:	390 mg/l
Is-sostanza tat-tilqim	L-impjant tat-trattament tal-ħmieġ tad-drenagġ ta'
Il-konċentrazzjoni:	gramma wahda tal-materjal niexef/litru
L-istatus ta' l-adattament:	mhux adattat
L-analiżi:	Id-determinazzjoni tad-DOC
L-ammont tal-kampjuni:	3 ml
Is-sostanza tal-kontroll:	Diethyleneglycol
Il-kompost tat-tossicità:	L-ebda effetti tossiċi taht l-1 000 mg It-test użat: Il-fermentazzjoni tat-tubi tat- test

Il-hin tat-test	Is-sustanza tal-kontroll				Is-sustanza tat-test		
	Id-DOC vojt mg/l	Id-DOC mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degra- dazzjoni %	Id-DOC mg/l	Id-DOC nett mg/l	Id-degra- dazzjoni %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 siegħat	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 ġurnata	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 ġranet	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 ġranet	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 ġranet	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 ġranet	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 ġranet	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 ġranet	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 ġranet	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

▼ B

Figura 1

Eżempji tal-kurvi tal-bijodegradazzjoni

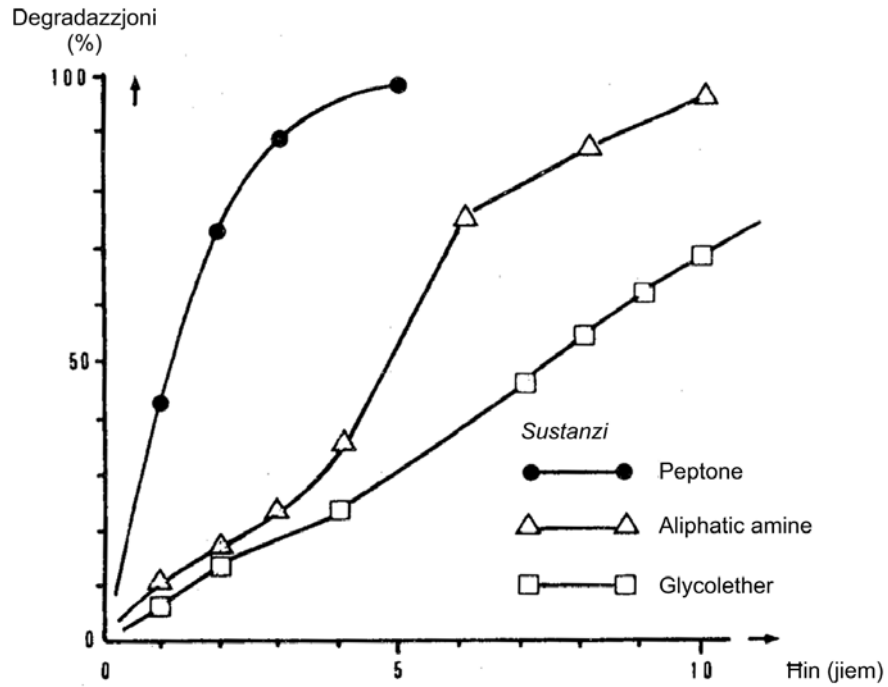
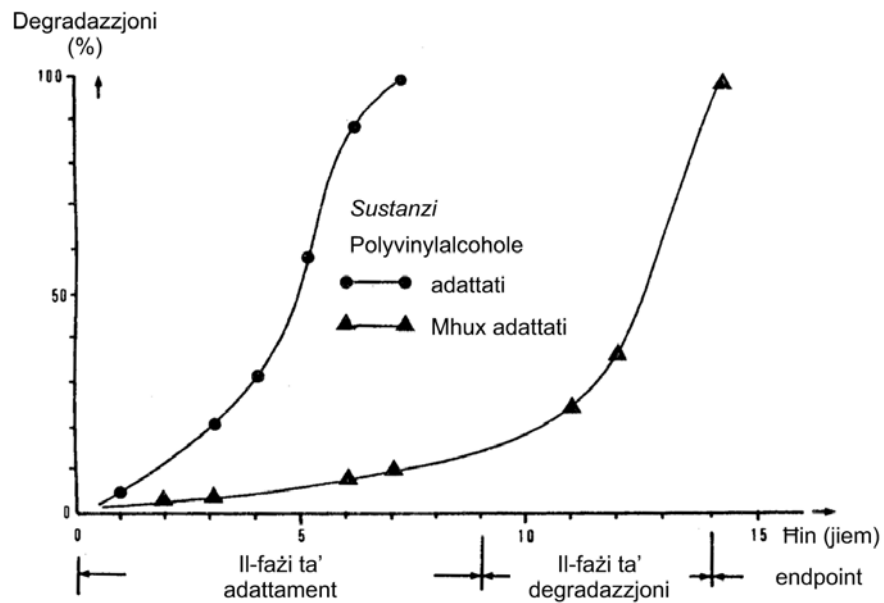


Figura 2

Eżempji ta' l-adattazzjoni tat-tajn ohxon



▼M4

**C.10. TRATTAMENT TA' SIMULAZZJONI TESTAEROBIKA TAD-
DRANAĠĠ: C.10-A: UNITAJIET TA' HAMA ATTIVAT - C.10-B:
BIJORITI****C.10-A: Unitajiet ta' Hama Aktivat****DAHLA**

1. Dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa ekwivalenti għall-Linja Gwida tat-Test (TG) 303 (2001) tal-OECD. Fil-hamsinijiet (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 tnehhew għalkollox fit-trattament aerobiku u f'xi każijiet kienu llimitaw it-tnehhija ta' materja organika ohra. Dan ġiegħel li jsiru hafna investigazzjonijiet dwar kif setghu jitnehhew tensjoattivi minn ilmijiet mormija u jekk kimiċi godda prodotti mill-industrija setghux ikunu ttrattati b'ilma mormi. Biex dan isir, intużaw unitajiet mudelli li kienu jirrapprezentaw iż-żewġ tipi ewlenin ta' trattament aerobiku u bijoloġiku ta' ilma mormi (hama attiv u jnixxi, jew iqattar, jiffiltra). Ma kienx ikun prattikabbli u kien jiswa hafna li kull kimika ġdida titqassam u li jsir monitoraġġ ta' impjanti tat-trattament ta' skala kbira, anki fuq bazi lokali.

KONSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU**Unitajiet ta' hama attiv**

2. Unitajiet mudell ta' hama attiv ġew deskritti li jvarjaw fid-daqs minn 300 ml sa madwar 2 000 ml. Uħud imitaw hafna l-impjanti ta' skala reali, li jkollhom tankijiet li fihom toqghod il-hama fejn il-hama 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 naha wahda 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 naha ohra l-apparat m'għandux ikun daqshekk kbir li jkun jehtieġu spazju u materjali eċċessivi.
3. Żewġ għamliet ta' apparat li ntuzaw b'mod estensiv u sodisfaċenti huma l-unitajiet Husmann (2) u l-unitajiet ta' Borma Poruza (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). Minhabb li kienu jiswew relattivament hafna u minhabba l-isforz li kien meħtieġ biex ikun applikat dan it-test ta' simulazzjoni, kienu mistharrġa 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 hafna tensjoattivi u kimiċi ohra wriet li daww li għaddew mit-testijiet tat-tgħarbil (bijodegradabbli faċilment) iddegradaw ukoll fit-test ta' simulazzjoni. Xi whud minn daww li m'għaddewx mit-testijiet tat-tgħarbil għaddew mit-testijiet tal-bijodegradabbiltà inerenti (il-Kapitolu 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 daww 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 wiehed ta' kondizzjonijiet operazzjonali jkunu suffiċjenti; ir-riżultati jkunu espressi bħala perċentwali ta' tnehhija tal-kimika għall-ittestjar jew tal-karbonju organiku mahlul (DOC). Deskrizzjoni ta' test bħal dan tingħata f'dan il-Metodu ta' Ttestjar. Izda, mhux bħal verżjoni ta' qabel ta' dan il-Kapitolu, li ddeskriviet tip wiehed biss ta' apparat li jittratta dranaġġ sintetiku fil-modalità akkoppjata bl-użu ta' metodu relattivament primittiv ta' rimi ta' hama,

▼M4

dan it-test joffri għadd ta' varjazzjonijiet. Huma deskritti alternattivi għat-tip ta' apparat, modalità ta' thaddim, dranaġġ u tnehhija ta' rimi ta' hama. Dan it-test isegwi mill-qrib dak ta' ISO 11733 (12), li kien eżaminat bir-reqqa matul it-thejġija tiegħu, għalkemm il-metodu ma tqiegħedx għal ringtest.

5. Għal għanijiet oħra, il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent jehtigilha tkun magħrufa b'aktar akkuratezza u għal dan jehtieg metodu aktar estensiv. Pereżempju, ir-rata ta' rimi ta' hama għandha tkun ikkontrollata b'mod aktar preċiż tul kull ġurnata u tul il-perjodu tat-test, u unitajiet għandhom jithaddmu 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. Izda 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 msemija hawn fuq, izda l-opinjoni ta' xi wħud hija li anki din fadlilha tkun issustanzjata. Testijiet f'konċentrazzjonijiet li jirriflettu aktar tassew dawk misjubi f'ilmijiet mormija huma indikati fl-Appendiċi 7, izda testijiet bħal dawn, u dawk fl-Appendiċi 6, huma inklużi f'Appendiċi-jiet minflok ma jinħarġu bħala Metodi ta' Ttestjar separati.

Filtri

6. Inghatat anqas attenzjoni lil filtri mudelli li jnixxu, forsi minhabba li huma aktar skomdi u anqas kompatti minn mudelli ta' impjanti ta' hama attivati. 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 dahħu strixxi tal-polyester "fleece" f'tubi ta' 1 m (dijametru intern ta' 14 mm) wara li l-istrixxi ddahħlu fil-hama 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-bijodegradazzjoni għet ivvalutata minn kejljiet ta' DOC fl-effluwent u d-CO₂ fil-gass li hareġ.
7. Biofiltri kienu ssimulati mod iehor (15); l-uċuħ ta' ġewwa ta' tubi li jduru, inklinati f'angolu żgħir mal-orizzontali, tqegħdihom 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 jinhallu fl-ilma b'mikroorganizmi aerobiċi f'sistema ta' ttestjar imhaddma kontinwament li tissimula l-proċess ta' hama attivati. Midjum organiku faċilment bijodegradabbli u l-kimika organika tat-test huma s-sorsi ta' karbonju u enerġija għall-mikroorganizmi.
9. Żewġ unitajiet ta' ttestjar imhaddmin kontinwament (impjanti ta' hama attivati jew borom porużi) jintużaw fl-istess waqt f'kondizzjonijiet identiċi li jintgħażlu biex ikunu adatti għall-fini tat-test. Normalment il-hin medju ta' retenzjoni idrawlika jkun ta' 6 sigħat u l-hama jkollu żmien medju (żmien ta' retenzjoni ta' hama) ta' minn 6 sa 10 ijiem. Il-hama jintrema b'wieħed minn żewġ metodi, il-kimika għall-ittestjar normalment tiżdied f'konċentrazzjoni ta' bejn 10 mg/l ta' karbonju organiku mahlul (DOC) u 20 mg/l DOC, mal-influwent (midjum organiku) ta' wahda biss mill-unitajiet. It-tieni unità tintuża bħala unità ta' kontroll biex tkun iddeterminata l-bijodegradazzjoni tal-midjum organiku.

▼ M4

10. F'kampjuni mehudin sikwit tal-effluwenti, ikun iddeterminat id-DOC, preferibbilment, jew id-domanda kimika ta' ossiġnu (COD), flimkien mal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar (jekk ikun mehtieg) b'analizi 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 minhabba l-kimika għall-ittestjar jew il-metaboliti organiċi tagħha. Din id-differenza titqabbel mal-konċentrazzjoni ta' influwenti ta' DOC jew ta' COD minhabba kimika għall-ittestjar miżjuda biex tkun iddeterminata l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.
11. Il-bijodegradazzjoni tista' normalment tingharaf minn bijosorbiment b'eżami sewwa tal-kurva ta' eliminazzjoni-żmien/hin 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 jinhallux ma jistgħux ikunu ttestjati sakemm ma jittehdux 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 mahlul (DOC) u domanda kimika ta' ossiġnu (COD).
13. Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganizmi (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 originali ta' dan it-test ta' simulazzjoni (konfermatorju) għall-bijodegradazzjoni primarja ta' tensjoattivi, tkun mehtiega tnehhija 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 ingenerali mhix kwistjoni ta' jekk ikunx hemm pass/falliment u l-valur ta' perċentwali ta' tnehhija miksub jista' jintuża f'kalkulazzjonijiet prossimi tal-konċentrazzjoni ambjentali probabbli biex jintuża fi stimi tal-perikli li jgħibu kimiċi. Riżultati aktarx isegwu xejra ta' kollox jew xejn. F'għadd ta' studji tal-kimiċi puri l-perċentwali ta' tnehhija 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-dranagħ 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' tnehhija 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. Izda t-tekniki sperimentali mehtiega għadhom ma ġewx ivvalidati għal-kollox u lanqas ma għadhom ġew stabbiliti l-mudelli kinetiċi li jiddeskrivu r-reazzjonijiet ta' bijodegradazzjoni (ara l-Appendiċi 7).

▼ **M4****KIMIČI 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 mistharġa 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' TESTIJET

17. Kien hemm bil-wisq anqas rapporti ta' studji ta' testijiet ta' simulazzjoni milli ta' testijiet għal bijodegradabbiltà faċli. Riproduċibbiltà bejn replikati (simultanji) hija tajba ($F_{10-15\%}$) għall-kimiċi għall-ittestjar iddegradati bi 80 % jew aktar, iżda għall-kimiċi anqas iddegradati sewwa l-varjabbiltà hija akbar. Ukoll għal xi kimiċi dubjużi kienu rreġistrati riżultati differenti għal-kollox minn xulxin (eż. 10 %, 90 %) f'okkażjonijiet differenti fi żmien 9 ġimħat permessi fit-test.
18. Fit 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 mehtieġa 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' hama attivata, unità Husmann (Appendiċi 1, Figura 1) jew borma poruża (Appendiċi 1, Figura 2). Fiż-żewġ każijiet ikunu mehtieġa reċipjenti ta' hzin ta' daqs suffiċjenti għall-influenti u l-effluenti, kif ukoll pompi biex jiddożaw l-influent, mhallat ma' soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar jew b'mod separat.
20. Kull unità ta' impjant ta' hama attivata tikkonsisti minn reċipjent ta' tirwih b'kapacità magħrufa ta' madwar 3 litri ta' hama attivata u li jkollu separator (kjarifikatur sekondarju) li jkun jesa madwar 1,5 litri; il-volumi jistgħu, sa ċertu punt, jinbidlu billi jkun aġġustat l-għoli tas-separator. Reċipjenti ta' daqs differenti jkunu permissibbli jekk jithaddmu b'pizijiet 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-hama attivata mis-separator għar-reċipjent ta' tirwih, 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 fit 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 hoxnin 2 mm. Is-separazzjoni tal-hama mill-midjum organiku ttrattat issir b'passaġġ differenzjali minn naħa għal oħra tal-hajt poruż. Effluenti jingabru fl-Ispazju annulari minn fejn ifuru għal gor-reċipjent tal-ġbir. Ma jkun hemm ebda hama qiegħed u, għalhekk, ma jiġix hama lura. Is-sistema

▼ **M4**

kollha tista' titrikkeb f'banjumarija kkontrollat termostatikament. Borom porużi jissaw miżdudin u jistgħu jfuru fl-istadji tal-bidu. F'każ bħal dan, ibdel l-inforra poruża b'wahda nadifa billi l-ewwel tghaddi minn go sifun il-hama mill-borma għal go barmil nadif u tneħhi l-inforra miżduda. Wara li timsaħ sewwa ċ-ċilindru estern li minnu ma jghaddix l-ilma, dahħal inforra nadifa u erga' qiegħed il-hama fil-borma. Xi hama li jeħel mal-ġnub tal-inforra miżduda jitqaxxar bil-galbu u jittiehed band'ohra. L-ewwel naddaf il-borom miżduda billi tuża ġett irqiq ta' ilma biex tneħhi l-hama li jkun fadal u billi tghaddashom f'soluzzjoni dilwita ta' ipoklorit tas-sodju, mbagħad fl-ilma, u wara laħlah sewwa bl-ilma.

22. Għal tirwih tal-hama fir-reċipjenti ta' tirwih taż-żewġ sistemi, jehtieġu tekniki adatti, pereżempju kubi sinterizzati (ġebel diffuż) u arja kkompressa. L-arja għandha titnaddaf, jekk ikun mehtieġ, billi tghaddi minn filtru adatt u tinhasel. Mis-sistema għandha tghaddi arja suffiċjenti biex jinżammu kondizzjonijiet aerobiċi u biex partiċelli ta' hama jinżammu f'sospensjoni l-hin 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 jinhallu u jerħu karbonju organiku fi grad minimu. Jekk jintużaw filtri li jerħu karbonju organiku, aħsel il-filtri sewwa b'ilma sħun biex tneħhi karbonju organiku li jliessi. Alternattivament jista' jintuża ċentrifugu li jkun kapaċi jipproduċi 40 000 m/s².

Tagħmir analitiku

24. Apparat mehtieġ biex ikun iddeterminat:
- DOC (karbonju organiku maħlul) u TOC (karbonju organiku totali) jew COD (domanda kimika ta' ossiġnu);
 - kimika speċifika, jekk tkun mehtieġa;
 - 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 mhix magħrufa diġà.
26. Ilma dejonizzat, li jkun fih anqas minn 2 mg/l ta' DOC.

Midjum organiku

27. Dranaġġ sintetiku, dranaġġ domestiku jew tahlita tat-tnejn huma permissibbli bħala l-midjum organiku. Intwera (11)(14) li l-użu ta' dranaġġ domestiku wahdu sikwit jagħti perċentwali miżjud ta' tneħhija ta' DOC u anki jippermetti t-tneħhija 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-hama attivata, 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 jehtieġli li jiżdiedlu lqugh 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' tirwih matul it-test. Kemm ikollu jiżdied ilqugh, u meta jkollu jiżdied, għandu jkun deċiż għal kull każ għalih wahdu. Meta jintużaw tahlitiet kontinwament jew kull tant, DOC (jew COD) tat-tahlita għandu jinżamm bejn wiehed u iehor f'valur kostanti, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma.

▼ M4

Dranagġ sintetiku

28. Holl 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 ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 4 mg; ettaidrat tas-sulfat tal-manjeżju ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$), 2 mg. Dan id-dranagġ sintetiku tal-OECD huwa eżempju u jagħti konċentrazzjoni medja tad-DOC fl-influent 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 influent inqas konċentrat, iddilwixxi d-dranagġ sintentiku, pereżempju 1:1 bl-ilma tal-vit biex tikseb konċentrazzjoni ta' madwar 50 mg/l. Influent iktar dgħajef bħal dan se jippermetti tkabbir aħjar tal-organizmi li jinnitrifikaw u din il-modifika għandha tintuża jekk is-simulazzjoni tal-impjanti tal-ilma mormi li jinnitrifikaw għadnha tiġi investigata. Dan id-dranagġ 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 sodisfacenti, eż. il-konċentrazzjoni ta' nitroġenu hija għolja ħafna, relattivament b'kontenut ta' karbonju baxx, iżda ma kien issuggerit xejn aħjar, hlief li jiżdied aktar fosfat bħala l-quġ u peptun żejjed).

Dranagġ domestiku

29. Uża dranaġġ qiegħed frisk miġbur kuljum minn xogħlijiet ta' trattament li jirċievu b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Dan għandu jingabar, qabel sedimentazzjoni primarja, mill-kanal tat-tifwir tat-tank ta' sedimentazzjoni primarja, jew mill-ghalf għall-impjant tal-ħama attiv, u jkun kważi kollu hieles minn partiċelli raffi. Id-dranagġ ikun jista' jintuża wara l-ħzin għal diversi jiem (iżda ġeneralment m'għandhomx jinqabzu 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-ħzin. Biex ikun illimitat taqlib fis-sistema, DOC (jew COD) ta' kull lott għdid għandhom ikunu aġġustati qabel ma jintużaw għal valur kostanti xieraq, eż. b'dilwizzjoni bl-ilma tal-vit.

Ħama attiv

30. Iġbor ħama attiv għal tilqim mit-tank ta' tirwih ta' impjant imħaddem tajjeb ta' trattament ta' ilma mormi jew mil-laboratorju unità ta' skala ta' ħama attiv, li tittratta l-aktar dranaġġ domestiku.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar

31. Għall-kimiċi li jinħallu b'mod adegwat, hejji soluzzjonijiet ta' stokkijiet f'konċentrazzjonijiet xierqa (eż. 1 sa 5 g/l) f'ilma dejonizzat, jew fil-porzjon minerali tad-dranagġ 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-kejljiet għal kull lott għdid. Jekk id-differenza bejn DOC u TOC tkun aktar minn 20 %, iwwerifika jekk il-kimika għall-ittestjar tinħallx fl-ilma. Qabbel id-DOC jew il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar imkejla b'analizi 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 għdid, kejjel DOC, COD jew il-kimika għall-ittestjar ma' analizi speċifika.

▼M4

32. Iddetermina pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Valuri estremi jindikaw li ż-żieda tal-kimika jista' jkollha influwenza fuq pH tal-hama attivata fis-sistema ta' ttestjar. F'dan il-każ innewtralizza s-soluzzjoni ta' stokkijiet biex tikseb pH ta' $7 \pm 0,5$ b'ammonti żgħira ta' aċidu jew bażi inorganici, iżda evita l-precipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

PROCEDURA

33. Il-proċedura hija deskritta għall-unitajiet ta' impjanti ta' hama attivata; għandha tkun adattata xi ftit għas-sistema tal-borma poruża.

Thejija tat-tilqima

34. Laqqam is-sistema ta' ttestjar fil-bidu tat-test bil-hama attivata jew b'tilqima li jkun fiha konċentrazzjoni baxxa ta' mikroorganiżmi. Żomm it-tilqima mrewħa f'temperatura ambjentali sakemm tintuża u użaha f'hin ta' 24 siegħa. Fl-ewwel każ, hu kampjun ta' hama attivata 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, hu hama minn impjant ta' nitrifikazzjoni ta' trattament ta' ilma mormi. Iddetermina l-konċentrazzjoni ta' solidi sospizi u, jekk ikun mehtieg, ikkonċentra l-hama billi thallieh joqghod 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 tiehu kemm jista' jkun hafna speċijiet differenti ta' batterja, jista' jkun ta' għajjuna jekk iżżid tilqimiet minn diversi sorsi oħra, pereżempju ilma tal-wiċċ. F'dan il-każ, il-hama attivata 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 tneħhi 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. Hejji volum suffiċjenti tal-midjum organiku mehtieg (paragrafi 27-29). Fil-bidu imla r-reċipjent ta' tirwiħ u s-separatur bil-midjum organiku u zid it-tilqima (paragrafi 34, 35). Ibda t-tirwiħ b'mod li l-hama jinżamm f'sospensjoni u fi stat aerobiku u ibda ddoża l-influwent u rriċikla l-hama qiegħed. Iddoża l-midjum organiku barra mir-reċipjenti ta' hzin għal gor-reċipjenti ta' tirwiħ (paragrafi 20, 21) tat-test u kkontrolla unitajiet u iġbor l-effluwenti rispettivi f'reċipjenti simili ta' hzin. Biex iġġib il-hin 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 tiehu nota tat-tnaqqis fil-volumi tal-midjum fil-kontenituri tal-hzin. Modalitajiet oħra ta' dożar ikunu mehtieġa biex ikunu ddeterminati l-effetti ta' meta jkun hemm rehi kull tant u tagħbija "hasda" tal-kimiċi.
37. Jekk il-midjum organiku jithejja biex jintuża għal perjodu itwal minn jum wiehed (1), ikunu mehtieġa tkessi f'madwar 4 °C jew metodi oħra adatti ta' konservazzjoni biex ma jithallix ikun hemm tkabbir mikrobiku u bijodegradazzjoni 'l barra mill-unitajiet ta' ttestjar (paragrafu 29). Jekk jintuża dranaġġ sintetiku, ikun possibbli tithejja, u tinhażen f'madwar 4 °C, soluzzjoni konċentrata ta' stokkijiet (eż. 10 darbiet il-konċentrazzjoni normali, paragrafu 28). Din is-soluzzjoni ta' stokkijiet tista' tithallat sewwa mal-volum adatt ta' ilma tal-vit qabel ma tintuża; alternattivament, tista' tkun ippumpjata direttament waqt li l-ammont adatt ta' ilma tal-vit ikun ippumpjat separatament.

▼ **M4***Dożagġ tal-kimika għall-ittestjar*

38. Żid volum adatt tas-soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar (paragrafu 31) fir-reċipjent ta' hżin tal-influwent jew iddożah direttament b'pompa separata għal ġor-reċipjent ta' tirwih. Il-konċentrazzjoni medja normali tal-ittestjar fl-influwent għandha tkun bejn 10 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 isehhu 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 jiżiedu l-kimiċi għall-ittestjar imxerrdin li fiit jinhallu fl-ilma billi jintużaw tekniki speċjali ta' dożar, ara l-Appendiċi 5).
39. Ibda zid il-kimika għall-ittestjar wara perjodu li fi h is-sistema tkun saret stabbli u tkun qed tneħhi DOC tal-midjum organiku b'mod effiċjenti (madwar 80 %). Huwa importanti li tara li l-unitajiet kollha jkunu qed jahdmu l-istess b'mod effiċjenti qabel ma tiżdied kimika għall-ittestjar; jekk ma jkunux, is-soltu jkun ta' għajjnuna li hama jithallat ma' iehor u li jerġghu jitqassmu volumi ndaqs lil unitajiet individwali. Meta tintuża tilqima ta' (madwar) 2,5 g/l (piż fin-niexef) ta' hama attivata, il-kimika għall-ittestjar tista' tiżdied mill-bidu tat-test minhabba li zieda diretta ta' aktar ammoniti mill-bidu għandha l-vantaġġ li l-hama attivata ikun jista' jadatta ahjar 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' hżin jitkejlu f'intervalli regolari.

Maniġġar ta' hama attivata

40. Il-konċentrazzjoni ta' solidi ta' hama attivata 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-mikroorganizmi li jkun hemm u l-influenza tal-kimika għall-ittestjar.
41. Iddetermina s-solidi sospiżi fir-reċipjenti ta' tirwih għall-anqas darba fil-gimgha u warrab hama żejjed biex iżzomm il-konċentrazzjoni f'1 g/l sa 3 g/l (piż fin-niexef), jew ikkontrolla kemm, bhala medja, ikollha żmien il-hama, f'valur kostanti, is-soltu fil-firxa ta' 6 ijiem sa 10 ijiem. Jekk, pereżempju, jingħazel żmien ta' retenzjoni ta' hama ta' 8 ijiem, neħhi kuljum 1/8 tal-volum tal-hama attivata fir-reċipjent ta' tirwih u warrbu. Aghmel dan kuljum jew, ahjar, permezz ta' pompa taħdem awtomatikament minn hin għal iehor. Iz-żamma tal-konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi b'mod kostanti, jew f'limiti stretti, ma żzommx żmien kostanti ta' retenzjoni ta' hama (SRT), li huwa l-varjabbli operazzjonali li jiddetermina l-valur tal-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fl-effluwent.
42. Matul it-test kollu, neħhi, mill-anqas kuljum, kull hama li jehel mal-hitan tar-reċipjent ta' tirwih u mas-separatur biex jerġa' jkun sospiż. Ikkontrolla u naddaf regolarment it-tubi kollha u s-sistema tat-tubi biex ma thallix tikber bijorita. Irriċikla l-hama li jkun qagħad mis-separatur għal ġor-reċipjent ta' tirwih, preferibbilment b'ippumpjar kull tant hin. Ebda riċiklar ma jsir fis-sistema ta' borma poruża iżda żgura li borom ta' gewwa jiddaħhlu nodfa qabel ma l-volum fir-reċipjent joghla b'mod sinifikanti (paragrafu 21).
43. Jista' jkun hemm hama li ma joqgħodx tajjeb u telf ta' hama fl-unitajiet ta' impijanti Husmann. Dan jista' jissewwa billi ssir azzjoni wahda jew aktar, elenkati hawn taht, fl-istess waqt tat-test u tal-unitajiet ta' kontroll:
- hama friska jew flocculi (pereżempju 2 ml/reċipjent ta' 50 g/l FeCl_3) jistgħu jiżiedu f'intervalli regolari, eż. kull gimgha, iżda aċċerta li ma jsehhu ebda reazzjoni jew preċipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ma' FeCl_3 ;

▼ M4

- il-pompa ta' estrazzjoni bl-arja tista' tiġi sostitwita b'pompa peristaltika, biex b'hekk ikun jista' jkun hemm fluss ta' ċirkulazzjoni mill-gdid ta' hama li jkun kważi daqs il-fluss tal-influent li jkollu jintuża u li jippermetti żvilupp ta' zona anaerobika fil-hama qiegħed (il-ġeometrija tal-pompa ta' estrazzjoni bl-arja tillimita r-rata minima ta' fluss ta' hama li jkun mar lura għal madwar 12-il darba ta' dik tal-influent);
- hama jista' jiġi ppumpjat minn hin għal iehor mis-separatur għal gor-reċipjent ta' tirwih (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 jithallix ikun hemm telf minhabba r-ragħwa (eż. żejt tas-silikon);
- l-arja tista' tiġi mghoddija mill-hama fis-separatur bi skossi qosra, mfatta (eż. 10 sek. kull siegħa);
- il-midjum organiku jista' jiġi ddoċat f'intervalli fir-reċipjent ta' tirwih (eż. 3 minuti sa 10 minuti kull siegħa).

Tehid ta' kampjuni u analiżi

44. F'intervalli regolari kejjel il-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlul, it-temperatura u l-valur pH tal-hama attivat fir-reċipjenti ta' tirwih. Żgura li dejjem ikun hemm ossigenu biżżejjed (> 2 mg/l) u li t-temperatura tinżamm fil-firxa meħtieġa (normalment 20°C sa 25°C). Żomm il-pH f' $7,5 \pm 0,5$ billi tiddoża ammonti żgħira ta' bazi inorganiku jew aċidu fir-reċipjent ta' tirwih jew fl-influent, jew billi żżid il-kapaċità ta' l-qiegħ 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-kejl jkun 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-influenti għar-reċipjenti ta' kontroll u ttestjar. Kejjel il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-influent tat-test b'analizi speċifika jew stmaha mill-konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ta' stokkijiet (paragrafu 31), mill-volum użat u mill-ammont ta' dranaġġ iddożat għal għol-unità ta' ttestjar. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar tkun ikkalkulata biex titnaqqas il-varjabbiltà tad-dejta tal-konċentrazzjoni.
46. Hu kampjuni adatti mill-effluent miġbur (eż. komposti ta' 24 h) u ffiltra minn go membrana b'pori ta' daqs ta' $0,45\ \mu\text{m}$ jew aghmel ċentrifugu minnhom f' madwar $40,000\ \text{m/s}^2$ 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'analizi b'mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar.
47. L-użu ta' COD jista' jgħib 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 hafna, huwa rrakkomandat li l-ammont ta' kimika assorbita fil-hama titkejjel billi tintuża teknika analitika b'mod speċifiku għall-kimika għall-ittestjar.
48. Il-frekwenza ta' teħid ta' kampjuni tiddependi minn kemm ikun mistenni jidm it-test. Frekwenza rrakkomandata tkun ta' tliet darbiet fil-ġimgħa. Malli l-unitajiet ikunu qed jahdmu b'mod effiċjenti, halli minn ġimgħa sa mhux aktar minn 6 ġimgħat wara li l-kimika għall-ittestjar tkun iddahhlet, biex din tadatta u tilhaq 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.

▼ **M4**

49. Jekk il-hama 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-tastjiet ta' ttestjar u ta' kontroll mill-anqas darba fil-gimha għall-ammonju u/jew nitrit flimkien ma' nitrat.
50. L-analizi kollha għandha ssir malajr kemm jista' jkun, l-aktar id-determinazzjonijiet tan-nitroġenu. Jekk analizi jkollha tiġi posposta, aħżen il-kampjuni f'madwar 4 °C fid-dlam fi flieken mimlijin u magħluqin issikkati. Jekk kampjuni jkollhom jinħażnu għal aktar minn 48 siegħa, ippreservahom fil-frizja, 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' analizi.

Akkoppjar ta' unitajiet ta' ttestjar

51. Jekk ikollu jintuza akkoppjar (Appendiċi 3), ibdel kuljum l-istess ammont ta' hama attivata (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 hafna mill-hama, ibdel biss is-supernatant tas-separaturi. Fiż-żewġ każijiet uża fattur ta' korrezzjoni biex tikkalkula r-riżultat tat-test (paragrafu 55).

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament ta' riżultati**

52. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-kimika għall-ittestjar għal kull valutazzjoni li jkun ittehdilha l-hin, billi tuża l-ekwazzjoni:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_0)}{C_s} \times 100$$

fejn

 D_t = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD f'hin t C_s = DOC jew COD fl-influent minhabba l-kimika għall-ittestjar, preferibbilment stmat mis-soluzzjoni ta' stokkijiet (mg/l) E = valur imkejjel ta' DOC jew COD fl-effluwent tat-test f'hin t (mg/l) E_0 = valur imkejjel ta' DOC jew COD fl-effluwent tal-kontroll f'hin 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-hama attivata matul it-test. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni bl-ekwazzjoni:

$$D_B = \frac{C_M - E_0}{C_M} \times 100$$

fejn

 D_B = % ta' eliminazzjoni ta' DOC jew COD tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll f'hin t C_M = DOC jew COD tal-midjum organiku fl-influent tal-kontroll (mg/l)

▼ **M4**

B'mod fakultattiv, ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni DOC jew COD minhabba 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' influent totali tat-test DOC jew COD

C_T = DOC jew COD ta' influent totali tat-test jew ikkalkulat mis-soluzzjonijiet ta' stokkijiet (mg/l)

54. Ikkalkula t-tnehhija 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'hin t

S_i = konċentrazzjoni mkejla jew stmata tal-kimika għall-ittestjar fl-influent tat-test (mg/l)

S_e = konċentrazzjoni mkejla tal-kimika għall-ittestjar f'effluwent ta' test f'hin t (mg/l)

55. Jekk tkun ntuzat il-modalità ta' akkoppjar, ikkumpensa d-dilwizzjoni tal-kimika għall-ittestjar fir-reċipjent ta' tirwih bl-iskambju ta' hama billi tuża fattur ta' korrezzjoni (ara l-Appendiċi 3). Jekk ikunu ġew użati hin medju ta' retenzjoni idrawlika ta' 6 s'ghat u skambju ta' nofs il-volum tal-hama attiv fir-reċipjent ta' tirwih, il-valuri determinati ta' eliminazzjoni kuljum (D_t , paragrafu 52) ikollhom ikunu kkoreġuti biex jinkiseb il-grad veru ta' eliminazzjoni, D_{tc} , 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-hin (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' tnehhija.

Sorbiment

57. Jekk tkun osservata eliminazzjoni għolja ta' DOC tal-kimika għall-ittestjar mill-bidu tat-test, il-kimika għall-ittestjar tkun probabbilmint eliminata b'sorbiment fis-solidi ta' hama attiv. Ikun possibbli li dan ikun ippruvat billi tkun iddeterminata l-kimika għall-ittestjar assorbita b'analizi 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' tnehhija 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 iehor, l-eliminazzjoni ta' DOC tal-kimika għall-ittestjar wara tiżdied u tilhaq valur livell kostanti għoli.

▼ **M4***Faži ta' intervalli*

58. Bhal f'testijiet statiči, ta' tgharbil, hafna kimiċi għall-ittestjar jehtiegu faži ta' intervalli qabel ma ssehh bijodegradazzjoni shiha. Fil-faži ta' intervalli, issehh akklimatazzjoni jew adattament tal-batterja li tkun qed tiddegrada minghajr ma kwaži tneħħa l-kimika għall-ittestjar; mbagħad issehh it-tkabbir tal-bidu ta' dawn il-batterji. Din il-faži tintemm u l-faži 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 issehh). Il-faži ta' intervalli sikwit tkun varjabbli hafna u bilkemm riproduċibbli.

Faži ta' livell kostanti

59. Il-faži ta' livell kostanti ta' kurva ta' eliminazzjoni f'test kontinwu hija ddefinita bħala dik il-faži li fiha ssehh id-degradazzjoni massima. Il-faži ta' livell kostanti għandha tkun mill-anqas ta' 3 ġimghat u jkollha madwar 15-il valur validu mkejje.

Grad medju ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

60. Ikkalkula l-valur medju mill-valuri ta' eliminazzjoni (D_t) tal-kimika għall-ittestjar fil-faži ta' livell kostanti. Miġjub għad-dritt sal-eqreb numru shih (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-hin. 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-hama attivata, 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' kwaži fiċ-ċert tkun attribwita lill-bijodegradazzjoni. Jekk tkun seħħet tneħħija inizzjali għolja, it-test ta' simulazzjoni ma jkunx jista' jiddivrenzja bejn proċessi ta' eliminazzjoni bijoloġiċi u abijotiċi. F'każijiet bħal dawn, u f'każijiet ohra meta jkun hemm xi dubju dwar il-bijodegradazzjoni (eż. jekk isir stripaġġ), analizza l-kimiċi għall-ittestjar assorbiti jew aghmel testijiet statiči 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 ġimghatejn u ma tkun saret ebda osservazzjoni mhux tas-soltu.

▼ **M4**

64. Jekk tkun intużat kimika (ta' referenza) bijodegradabbli faċilment, il-grad ta' bijodegradazzjoni (D_t , paragrafu 52) għandu jkun > 90 %.
65. Jekk it-test isir f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni, il-konċentrazzjoni medja fl-effluwenti għandha tkun < 1 mg/l ammonja-N u < 2 mg/l nitrit-N.
66. Jekk dawn il-kriterji (paragrafi 63-65) ma jitharsux, 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 fizika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fizikokimiċi.

Kondizzjonijiet tat-test:

- tip ta' sistema ta' ttestjar; kull modifika għall-ittestjar tal-kimiċi li ma jinhallux u jkunu volatili;
- tip ta' midjum organiku;
- proporzjon u natura ta' ilmijiet industrijali mormija fid-dranagg, 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 tithejja, 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-hama u hin medju ta' retenzjoni idrawlika; metodu ta' rimi ta' hama; metodi li jegħlbu l-kwantitajiet, telf ta' hama, eċċ.;
- tekniċi analitiċi użati;
- temperatura tat-test;
- kwalitajiet tal-kwantitajiet ta' hama, indiċi ta' volumi ta' hama (SVI), solidi sospiżi ta' likwidu mħallat (MLSS);
- kull devjazzjoni minn proċeduri standard u kull ċirkostanza li setgħet affettwat riżultati.

Riżultati tat-testijiet:

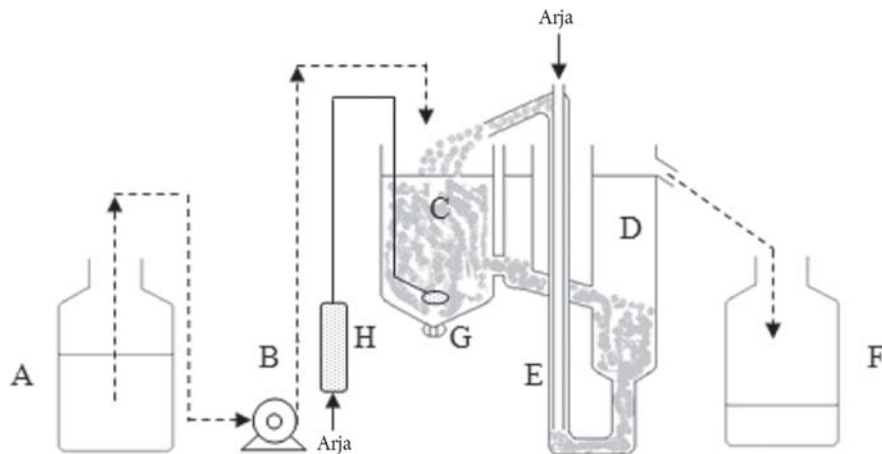
- dejta mkejla kollha (DOC, COD, analiżi speċifika, pH, temperatura, konċentrazzjoni tal-ossigenu, solidi sospiżi, l-kimiċi N, jekk rilevanti);
- il-valuri kollha kkalkolati ta' D_t (jew D_{tc}), D_B , D_{St} miksuba f'forma tabulari u l-kurvi ta' eliminazzjoni;
- informazzjoni dwar fażijiet ta' intervalli u ta' livelli kostanti, durata ta' testijiet, il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar u dak tal-midjum organiku fl-unità ta' kontroll, flimkien ma' informazzjoni dwar statistika u dikjarazzjonijiet dwar il-bijodegradabbiltà u l-validità tat-test;
- diskussjoni dwar ir-riżultati.

▼M4*LETTERATURA:*

- (1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
- (2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.
- (3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
- (4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.
- (5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
- (6) Chapter C.4 of this Annex, Determination of 'Ready' Biodegradability.
- (7) Chapter C.12 of this Annex, Biodegradation - Modified SCAS Test.
- (8) Chapter C.19 of this Annex, Estimation of the Adsorption Coefficient (K_{OC}) on Soil and on Sewage Sludge Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
- (9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.
- (10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
- (11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.
- (13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
- (14) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
- (15) Gerike P, Fischer WK u Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.
- (16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.
- (18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

▼ **M4***Appendiċi 1**Figura 1***Tagħmir użat għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà**

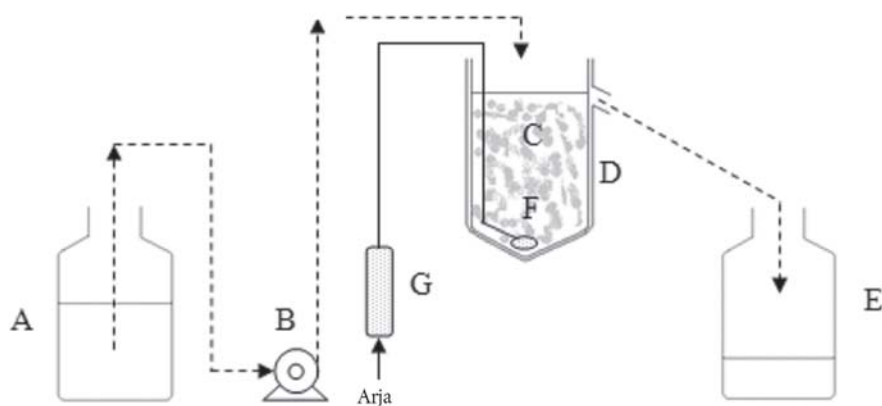
Unità Husmann



A. Reċipjent ta' hżin	E. Pompa ta' estrazzjoni bl-arja
B. Pompa tad-dożar	F. Reċipjent ta' ġbir
C. Kompartiment ta' tirwih (3 l kapacità)	G. Rewwieh
D. Reċipjent ta' sediment	H. Miter ta' fluss ta' arja

*Figura 2***Tagħmir użat għall-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà**

Borma poruża

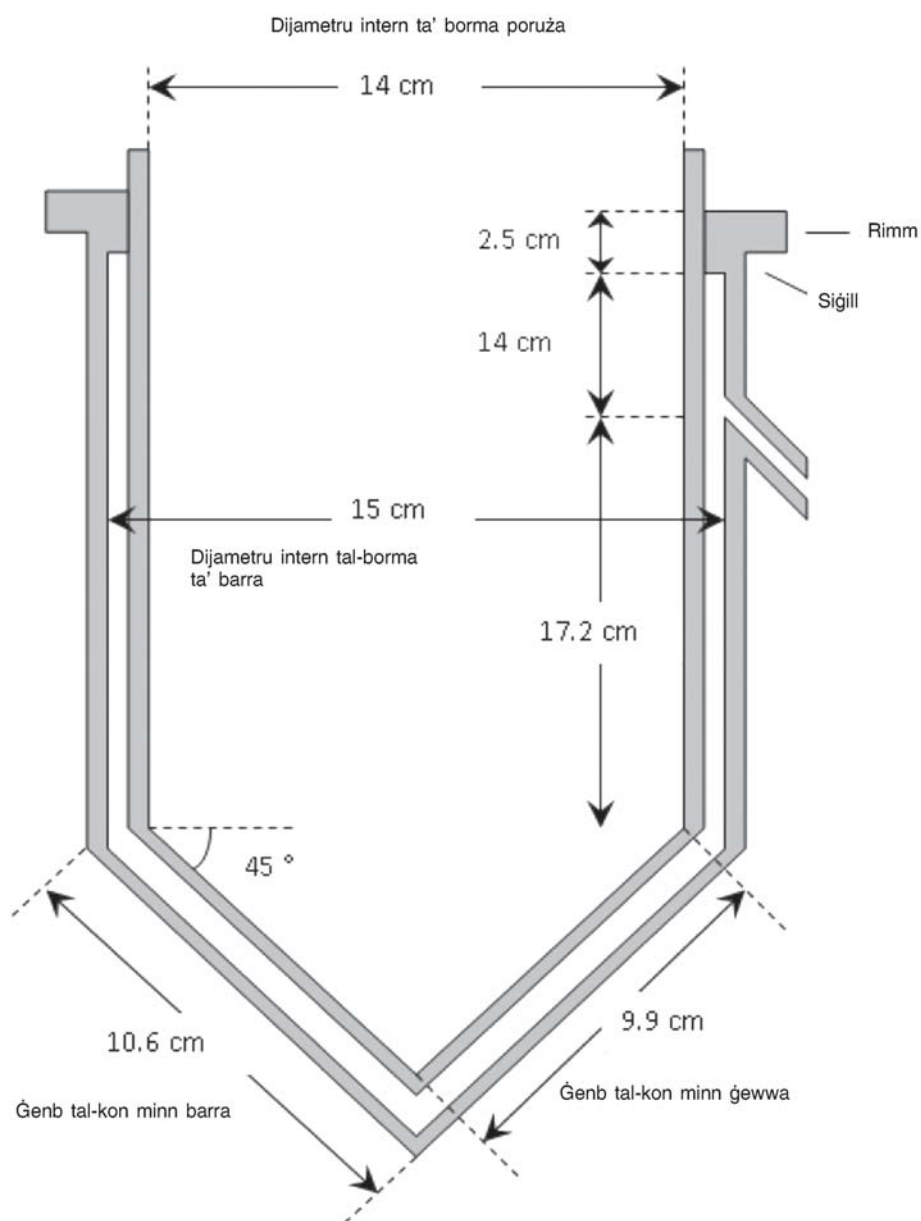


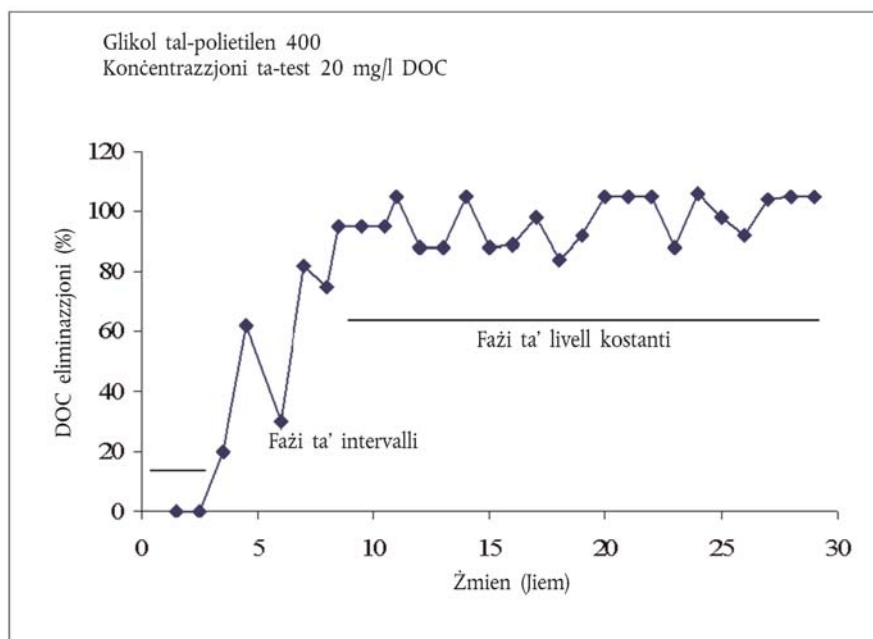
A. Reċipjent ta' hżin	E. Reċipjent ta' ġbir
B. Pompa tad-dożar	F. Diffużur
C. Borma poruża ta' tirwih	G. Miter ta' fluss ta' arja
D. Reċipjent ta' barra impermeabbli	

▼ **M4**

Figura 3

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



▼ **M4***Appendiċi 2***Eżempju ta' kurva ta' eliminazzjoni**

▼ **M4***Appendiċi 3*

[INFORMATTIV]

AKKOPPJAR TAL-UNITAJIET TA' TTESTJAR

Għall-tentattiv biex il-mases mikrobiċi jkunu ndaqs f'ħama f'unità ta' ttestjar, li tirċievi dranaġġ flimkien ma' kimika għall-ittestjar, u f'unità ta' kontroll, li tirċievi dranaġġ biss, kien introdott skambju ta' ħama kuljum (1). Il-proċedura ssejjet akkoppjar u l-metodu huwa magħruf bħala unitajiet akkoppjati. L-akkoppjar għall-bidu kien isir billi kienu jintużaw unitajiet Husmann ta' ħama attiv, 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'hele ta' żmien u enerġija meħtieġa biex unitajiet ikunu akkoppjati.

Skambju ta' ħama jista' jagħti dehra ta' tneħħija tassew konsiderevoli, minhabba li xi ftit mil-kimika għall-ittestjar tiġi ttrasferita u l-koncentrazzjonijiet 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 attiv

r = ħin medju ta' retenzjoni idrawlika (h)

Jekk, pereżempju, nofs il-volum tat-tank ta' tirwiħ ikun skambjat ($a = 0,5$) u l-ħin medju ta' retenzjoni idrawlika jkun 6 h, il-formula ta' korrezzjoni tkuna:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LETTERATURA:

- (1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.
- (2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼ **M4***Appendiċi 4***EVALWAZZJONI TA' INIBIZZJONI TAL-HAMA ATTIVAT****Proċess b'kimiċi għall-ittestjar**

1. Kimika (jew ilma mormi) tista' ma tkunx iddegradata jew imnehhija fit-test ta' simulazzjoni u jista' wkoll ikollha effetti inibitorju fuq il-mikroorganizmi tal-hama. Kimiċi oħra jkunu ddegradati bijoloġikament f'konċentrazzjonijiet baxxi iżda jkunu inibitorji f'konċentrazzjoni oghla (ormesi). Effetti inibitorji setghu kienu ġew żvelati fi stadju aktar bikri jew jistghu jkunu ddeterminati bl-applikazzjoni ta' test tat-tossicità, 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-hama (ISO 15522 (4)).
2. Fit-test ta' simulazzjoni kull inibizzjoni tkun tidher mid-differenza ta' karbonju organiku mahlul (DOC) jew mid-domanda kimika ta' ossiġnu (COD) bejn l-effluwent mir-riċipjent tat-test u dak mill-kontroll li jkun akbar minn DOC miżjud bħala kimika għall-ittestjar. Espress mod iehor, il-perċentwali ta' tnehhija 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 isehh, it-test għandu jittenna billi jitnaqqas il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar sakemm jintlaħaq livell li fih ma ssehh ebda inibizzjoni u forsi jitnaqqas 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 bijoloġikament, iżda jista' jkun siewi li t-test jittenna b'hama attivata minn sors differenti u/jew il-hama 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 mehtieg li jkun magħruf jekk il-kimika jkollhiex tkun inibitorja.
4. Wiehed għandu jiftakar meta jipprova jiddetermina l-grad ta' inibizzjoni li l-massa ta' hama attivata tista' tinbidel, biex maż-zmien il-mikroorganizmi jkunu jistghu jiżviluppaw tolleranza għal kimika inibitorja.
5. Kalkulazzjoni ta' grad ta' inibizzjoni:

Il-perċentwali globali ta' tnehhija 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 riċipjenti ta' ittestjar u kontroll (mg/l)

E = konċentrazzjonijiet ta' effluwenti rispettivi (mg/l).

I u E għandhom ikunu kkoreġuti għal DOC minhabba l-kimika għall-ittestjar fl-unitajiet ta' test; mod iehor il-kalkulazzjonijiet ta' perċentwali ta' inibizzjoni ma jkunux korretti.

▼M4

Il-grad ta' inibizzjoni kkawżat meta jkun hemm il-kimika għall-ittestjar jista' jiġi kkalkulat minn:

$$\% \text{ inibizzjoni} = 100 (R_c - R_t) / R_c$$

fejn:

R_c = perċentwali ta' tneħhija fir-reċipjenti ta' kontroll

R_t = perċentwali ta' tneħhija 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' Hama Attivat.
- (3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- (4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼ **M4***Appendiċi 5***Kimiċi li f'it jinhallu fl-ilma - kimiċi volatili****Kimiċi li f'it jinhallu fl-ilma**

Ftit rapporti jidher li kienu ppubblikati dwar kimiċi li f'it jinhallu fl-ilma jew li ma jinhallux biex jitqiegħdu għal testijiet li jissimulaw trattament ta' ilma mormi (1)(2)(3).

M'hemmx metodu wiehed ta' tixrid tal-kimika għall-ittestjar li huwa applikabbli għas-kimiċi kollha li ma jinhallux. 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 perġodi ta' 24 siegħa tat-tixrid li jirrizulta. Tixridiet stabbilizzati kif jixraq, mqieghda f'rizerva li tithawwad b'mod kostanti (paragrafu 38), ikunu mbagħad iddożati mat-tank ta' tirwih b'mod separat mid-dranagg domestiku (jew sintetiku).

Jekk it-tixrid ikun stabbli, s'tharreg 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 hama attivati. X'jiġri mil-kimika għall-ittestjar fis-simulazzjoni tal-proċess ta' hama attivati imbagħad ikun iddeterminat f'faziġiet likwidi u solidi. B'hekk ikun stabbilit "bilanċ ta' massa" biex ikun deċiż jekk il-kimika għall-ittestjar kinitx iddegradata bijoloġikament. Izda dan jindika biss bijodegradazzjoni primarja. Il-wiri ta' bijodegradazzjoni finali għandu jkun attentat bl-applikazzjoni ta' test respirometrik għall-bijodegradabbiltà faċli (il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness (5) C, F jew D) billi jintuza hama 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. Bhal f'kimiċi li f'it jinhallu fl-ilma, jidher li kienu ftit hafna r-rapporti li kienu ppubblikati li jiddeskrivu testijiet ta' simulazzjoni bl-użu ta' kimiċi volatili. Ikun adattat tip konvenzjonali ta' apparat li jhallat kollox billi jissigilla t-tankijiet ta' tirwih u sediment, li jkejjel u jikkontrolla l-fluss ta' arja billi jintużaw miters ta' flussi u billi l-gass li johroġ jgħaddi minn sifuni biex tingabar materja organika volatili. F'xi każijiet tintuza pompa li tohloq vakwu biex tiġbed il-gass li johroġ minn sifun "kiesah", jew sifun ta' tindif li jkun fih Tenax u gell 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 jithaddmu minghajr hama iżda bl-ilma sintetiku mormi flimkien ma' kimika għall-ittestjar li tkun ippumpjata għal got-tank ta' tirwih. Jingabru u jkunu analizzati kampjuni ta' influwent, effluwent u gass rilaxxjat għall-kimika għall-ittestjar għal ftit jiem. Mid-dejta migbura jista' jkun ikkalkulat il-perċentwali (R_{vs}) tal-kimika għall-ittestjar imnezza' mis-sistema.

Mbagħad it-test bijoloġiku normali (bil-hama) isir f'kondizzjonijiet operazzjonali identiċi għal daww fl-istudju ta' stripagg. 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 johroġ 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' tnehhija tal-kimika għall-ittestjar mill-faży likwida bil-proċessi kollha (R_T) (fiziċi u bijoloġiċi), kif ukoll il-proporzjon (R_V) mnezza' mis-sistema.

▼M4

Kalkulazzjoni:

- (a) Fit-test mhux bijoloġiku, il-perċentwali (R_{VP}) tal-materjal tat-test imneżża' mis-sistema jista' jkun ikkalkulat minn:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

fejn

R_{VP} = tnehhija ta' kimika għall-ittestjar bil-volatilizazzjoni (%),

S_{VP} = kimika għall-ittestjar miġbura f'sifun espressa 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 = tnehhija ta' kimika għall-ittestjar bil-volatilizazzjoni 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 imneħhija 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}) mneħhija 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 halla fuq l-emissjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-atmosfera.

Eżempju: Benzen

Żmien ta' ritenzjoni ta' hama = 4 ijiem

Dranaġġ sintetiku; żmien ta' ritenzjoni = 8 sigħat

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22,5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼M4

Għalhekk,

$$R_{VP} = 100 \%, R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ u } R_{BA} = 85 \%$$

Ma kienx suppost li l-benzen jiġi sorbit fil-ħama.

LETTERATURA:

- (1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (5) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness: Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà "Faċli".

▼ M4

Appendiċi 6

Effetti taż-żmien ta' ritenzjoni ta' hama (SRT) fuq it-trattabbiltà ta' kimiċi

DAHLA

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' tnehhija u perċentwali ta' bijodegradazzjoni. Il-kondizzjonijiet ta' thaddim tal-unitajiet ta' hama attivati u ta' għażla ta' influwent jippermettu x'aktarx varjazzjonijiet wiesgħa f'koncentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-effluwent. Testijiet isiru f'koncentrazzjoni nominali wahda biss ta' solidi ta' hama jew f'hin nominali wiehed ta' retenzjoni ta' hama (SRT) u reġimi ta' rimi ta' hama deskritti jistgħu jikkawżaw li l-valur ta' SRT iwarja mhux hażin 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 hafna aktar doġo matul kull perjodu ta' 24 siegħa (kif sewwasew jiġri fuq l-iskala l-kbira) li jirriżulta f'koncentrazzjoni aktar kostanti fl-effluwenti. Huwa rrakkomandat dranaġġ domestiku minhabba li jagħti perċentwali ta' tnehhija aktar konsistenti u oghla. L-effetti wkoll ta' għadd ta' valuri ta' SRT ikunu mistharġa u fi studju aktar dettaljat ikunu jistgħu jiġu ddeterminati l-effetti ta' firxa ta' temperaturi fuq koncentrazzjoni 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. Gew magħżula l-mudell Monod tat-tkabbir tal-batterji u l-użu tas-sustrat (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'koncentrazzjoni ta' dranaġġ ta' iktar minn 1 mg/l. Il-validità tal-mudell simplifikat u l-assunzjonijiet li saru ġew stabbiliti permezz tal-użu ta' serje ta' ossilati tal-alkohol li jkollhom gradi varji ta' bijodegradabbiltà primarja (2)(3).

Nota. Dan il-metodu ta' varjant isegwi mill-qrib hafna 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' hama attivati, mfasslin biex jiffaċilitaw ir-rimi (kważi) kontinwu ta' likwidu mħallat li jippermettu kontroll preċiż hafna tal-żmien ta' retenzjoni ta' hama (SRT, jew θ_s), jithaddmu fil-modalità mhux akkoppjata tul firxa ta' SRTs u, fakultattivament, tul firxa ta' temperaturi. Il-hin 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 jithalltu b'mod separat mal-unitajiet f'rati li jagħtu z-żmien mehtieg ta' retenzjoni ta' dranaġġ (3 sa 6 sigħat) u l-koncentrazzjoni mehtieġa ta' kimika għall-ittestjar fl-influwent. Unitajiet ta' kontroll li ma jirċievi ebda kimika għall-ittestjar jithaddmu b'mod parallel għal finijiet komparattivi.
5. Tipi ohra ta' apparat jistgħu jintużaw iżda għandha tkun eżerċitata attenzjoni kbira biex ikun żgurat li jintlahaq kontroll tajjeb ta' SRT. Pereżempju, meta jintużaw impjanti, li jinkorporaw apparat ta' sediment, jista' jkun mehtieg li jsir tnaqqis għal telf ta' solidi mill-effluwenti tal-impjant. Barra dan, għandhom jittiehdu wkoll prekawzjonijiet speċjali biex ikunu evitati żbalji minhabba varjazzjoni fil-kwantità ta' hama fl-apparat ta' sediment.

▼ **M4**

6. L-unitajiet jithaddmu skont is-sett ta' kondizzjonijiet magħżul għal kull wahda minnhom u, wara li jintlaħaq ekwilibriju, il-konċentrazzjonijiet medji ta' stat regolari fl-effluventi ta' kimika għall-ittestjar u, fakultattivament f'DOC, jinkisbu tul perjodu ta' madwar tliet ġimgħat. Minbarra li jkun ivvalutat il-perċentwali ta' tnehhija ta' kimika għall-ittestjar u, fakultattivament DOC, ir-relazzjoni bejn kondizzjonijiet ta' thaddim 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 GHALL-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 GHALL-ITTESTJAR TA' REFERENZA

9. Japplika l-paragrafi 16 tal-Kapitolu C.10 A.

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TA' TESTIJET

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 polipropilil poruż ta' 3.2 mm ħxuna u pori daqs bejn wiehied u iehor 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 jghaddix 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-hama, u ċilindru fin-naha ta' fuq imwawħal bil-viti fil-baży u li jkollu fetha mqiegħda b'mod li tagħti volum magħruf (3 l) fir-reċipjent tal-borma poruża. Wahda mil-linji tal-arja titwawħlilha ġebbla diffuża u l-oħra tkun miftuha fit-tarf u mqiegħda f'angolu kwadru mal-ġebbla fil-borma. Din is-sistema tipproduċi t-turbulenza meħtieġa biex ikun żgurat li l-kontenut tal-borma jkun thallat għalkollox, kif ukoll tipprovdi konċentrazzjonijiet ta' ossiġnu mahlul 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 jenhtieġu żewġ pompi biex jiddożaw għal ġor-reċipjenti ta' tirwih 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 tneħhi hama mormi mir-reċipjenti ta' tirwih. Ir-rata ta' fluss ta' hama mormi tintlaħaq billi tintuża pompa ssettjata f'rata oġhla u mhaddma minn hin għal iehor bl-użu ta' swiċċ tal-hin, eż. li jahdem għal 10 sekondi kull minuta, b'pompa b'rata ta' hrug ta' 3 ml/min li tirrendi rata ta' rimi ta' 0,5 ml/min.

Apparat ta' filtrazzjoni jew ċentrifugu

13. Japplika l-paragrafu 23 tal-Kapitolu C.10 A.

Apparat analitiku

14. Japplika l-paragrafu 24 tal-Kapitolu C.10 A.

Ilma

▼ **M4**

15. Japplikaw il-paragrafi 25 u 26 tal-Kapitolu C.10 A.

Midjum organiku

16. Japplika l-paragrafu 27 tal-Kapitolu C.10 A.

Dranagġ sintetiku

17. Japplika l-paragrafu 28 tal-Kapitolu C.10 A.

Dranagġ domestiku

18. Japplika l-paragrafu 29 tal-Kapitolu C.10 A.

Hama 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.

PROCEDURA*Thejjija tat-tilqima*

21. Japplika biss il-paragrafu 34 tal-Kapitolu C.10 A – uża hama attivat (dwar 2,5 g/l).

Għadd ta' unitajiet ta' ttestjar

22. Għal test sempliċi, jiġifieri għall-kejl ta' perċentwali ta' tnehhija, ikun jehtieg SRT wiehed biss, izda biex tinkiseb dejta mehtieġa biex jitkejl kostanti kinetiċi tentattivi jkunu jehtieġu 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 wahda; fi studji estiżi jintużaw l-istess valuri ta' SRT, jew forsi firxa differenti ta' valuri, f'temperaturi ohra li jvarjaw minn 5 sa 20 °C. Għal bijodegradazzjoni primarja (l-użu ewlieni), normalment tkun mehtieġa unità wahda għal kull sett ta' kondizzjonijiet. Izda għal bijodegradabbiltà finali tkun mehtieġa unità ta' kontroll, għal kull sett ta' kondizzjonijiet, li tirċievi dranaġġ izda mhux kimika għall-ittestjar. Jekk il-kimika għall-ittestjar titqies li tkun fid-dranaġġ użat, ikun mehtieġ li jintużaw unitajiet ta' kontroll meta tkun qed tiġi vvalutata bijodegradazzjoni primarja, u li ssir il-korrezzjoni mehtieġa fil-kalkulazzjonijiet.

Dożaġġ ta' midjum organiku u kimika għall-ittestjar

23. Japplikaw il-paragrafi 36 sa 39 tal-Kapitolu C.10 A, izda nnota li s-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar tkun iddożata separatament u li jintużaw diversi rati ta' rimi ta' hama. Immonitorja u aġġusta wkoll sikwit, jekk ikun mehtieġ, sa $\pm 10\%$, ir-rata ta' fluss ta' influwenti, effluwenti u rimi ta' hama, eż. darbejn kuljum. Jekk jinqalghu diffikultajiet fil-metodi analitiċi meta jintuża dranaġġ domestiku, aghmel it-test bi dranaġġ sintetiku, izda għandu jkun żgurat li midja differenti jagħtu dejta kinetika komparabbli.

Maniġġar ta' unitajiet ta' hama attivat

24. Japplikaw il-paragrafi 40 sa 43 tal-Kapitolu C.10 A, izda kkontrolla l-SRT permezz tal-hela "kostanti" tal-hama biss.

Tehid ta' kampjuni u analiżi

25. Japplikaw il-paragrafi 44 sa 50 tal-Kapitolu C.10 A, hlief li l-koncentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar għandha tkun iddeterminata u DOC ikun iddeterminat fakultattivament; m'għandux jintuża COD.

▼M4

DEJTA U RAPPORTAR

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 iwarja ma' kondizzjonijiet ta' thaddim 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' hama.

(Alternattivament, valuri approssimattivi ta' K_s u μ_m jistgħu jinksibu permezz ta' programm sempliċi tal-kompjuter mfassal għall-kurva teoretika kkalkulata mill-ekwazzjoni 2 (Appendiċi 6.2) għall-valuri sperimentali miksuba. Għalkemm kwalunkwe soluzzjoni mogħtija mhux se tkun unika, tista' tinkiseb approssimazzjoni raġonevoli ta' K_s u μ_m .)

Varjabbiltà ta' riżultati

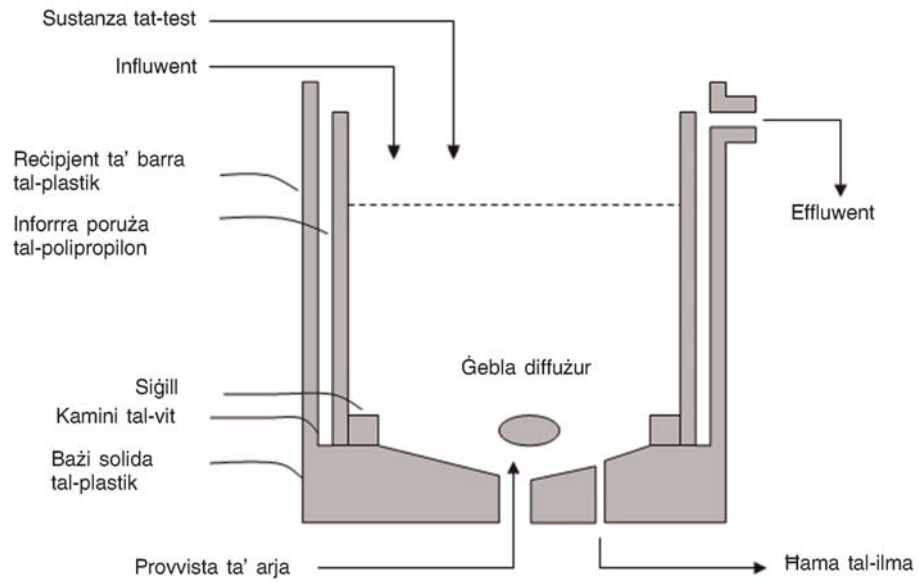
29. Hija esperjenza komuni li jinkisbu valuri varjabbli ta' parametri kinetiċi għal kimiċi individwali. Huwa maħsub li l-kondizzjonijiet li fihom il-hama jkun tkabbar, kif ukoll il-kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test użat (bħal fil-paragrafu 5 u f'testijiet oħra), għandhom effett kbir fuq il-valuri 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' tilhaq matul esperiment kinetiku. Jekk l-istat ma jithalliex jinbidel matul it-test, il-valuri tal-parametru kinetiku jirriflettu l-kondizzjonijiet fl-ambjent li minnu l-mikroorganizmi jkunu ttiehdu; dawn il-valuri jissejju "eżistenti" jew eżistenti bħalissa. Fl-estrem l-iehor, jekk kondizzjonijiet fit-test ikunu tali li jippermettu l-iżvilupp shih 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 mikroorganizmi kompetenti (S_0/X_0) jinżamm baxx, eż. 0.025, u jkun hemm valuri intrinsiċi meta l-proporzjon ikun għoli eż. mill-anqas 20. Fiż-żewġ każijiet, S_0 għandu jkun uguali għal jew jaqbeż il-valur rilevanti ta' K_s , 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 tohroġ ma ddumx stampa aktar ċara ta' kinetika li topera f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi biex tghin ikun hemm interpretazzjoni aħjar ta' dejta eżistenti, kif ukoll biex tissuġġerixxi disinji aktar rilevanti għal Metodi ta' Ttestjar fil-gejjieni.

LETTERATURA:

- (1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.
- (2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.
- (3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼ M4

- (4) Grady CPL, Smets BF u Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res.*, 30 (3): 742-748.
- (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Ewropa, Brussell.

▼ **M4***Appendiċi 6.1***Borma Poruża b'Kontroll SRT**

▼ **M4***Appendiċi 6.2***Kalkolu ta' Kostanti kinetiċi**

1. Jekk wiehed jassumi li l-kinetika Monod tapplika u meta jitqies bilanċ ta' massa ta' solidi u substrat attivi fis-sistema kollha ta' hama attivati (1), jistgħu jinkisbu dawn l-espressjonijiet ta' stat regolari li ġejjin:

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

jew

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

Fejn:

S_1 = konċentrazzjoni ta' substrat fl-effluwent, (mg/l)

K_s = kostant ta' nofs saturazzjoni, il-konċentrazzjoni li fiha $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = rata speċifika ta' tkabbir (d^{-1})

μ_m = valur massimu ta' $\mu_m(d^{-1})$

K_d = rata speċifika ta' dizintegrazzjoni ta' solidi attivi (d^{-1})

θ_s = żmien medju ta' retenzjoni ta' hama, SRT (d)

Eżami ta' din l-ekwazzjoni jwassal għall-konkluzjonijiet li ġejjin:

- (i) Il-konċentrazzjoni tal-effluwenti hija indipendenti minn dik fl-influent (S_0); għalhekk, il-perċentwali ta' bijodegradazzjoni tvarja mal-konċentrazzjoni tal-influenti, S_0 .
- (ii) L-uniku parametru ta' kontroll ta' impjanti li jaffettwa S_1 huwa ż-żmien ta' retenzjoni ta' hama, θ_s .
- (iii) Għal konċentrazzjoni partikolari fl-influent, S_0 , ikun hemm żmien kritiku ta' retenzjoni ta' hama, b'mod li:

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

Fejn:

θ_{SC} = żmien kritiku ta' retenzjoni ta' hama, li tahtu l-mikroorganizmi kompetenti jintefgħu 'l barra mal-hasil tal-impjant.

- (iv) Minhabba 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-hama, jiġifieri ż-żmien ta' ritenzjoni ta' hama mehtieg biex jinkiseb ċertu grad ta' trattament jizdied mat-tnaqqis fit-temperatura.
2. Minn bilanċ ta' massa ta' solidi fis-sistema ta' borma poruża, u jekk wiehed jassumi li l-konċentrazzjoni ta' solidi fl-effluwent tal-impjant, X_2 , tkun baxxa mqabbla ma' dik fir-riċipjent ta' tirwih, X_1 , il-żmien ta' ritenzjoni ta' hama

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

▼M4

u

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

fejn

V = volum tar-recipient ta' tirwih (l)

X₁ = konċentrazzjoni ta' solidi fir-recipient ta' tirwih (mg/l)X₂ = konċentrazzjoni ta' solidi fl-effluwent (mg/l)Q₀ = rata ta' fluss tal-influent (l/d)Q₁ = rata ta' fluss ta' hama mormi (l/d)

Għalhekk ikun possibbli li jkun ikkontrollat iż-żmien ta' ritenzjoni ta' hama f'kull valur magħżul minn qabel bil-kontroll tar-rata ta' fluss ta' hama mormi, Q₁.

Konkluzjonijiet:

3. L-għan ewlieni tat-test huwa, għalhekk, li jhalli jkun hemm il-konċentrazzjoni tal-effluwenti, u b'hekk ikunu previsti l-livelli ta' kimika għall-ittestjar fl-ilmijiet li jirċevuhom.
4. Bl-immakar ta' S₁, vs. θ_s, il-hin kritiku ta' retenzjoni ta' hama, 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-immakar ta' S₁, vs. S₁•θ_s.

Arrangament mill-ġdid tal-ekwazzjoni (1) jagħti

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

Jekk K_d jkun żgħir, allura 1 + θ_s • K_d ~ 1 u [5] isir:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

Għalhekk, il-grafika għandha tkun linja dritta (ara l-Figura 2) tal-anglu 1/μ_m u l-interċezzjoni K_s/μ_m; ukoll θ_s ~ 1/μ_m.

▼ M4

Figura 1

Tliet temperaturi; hames SRTs

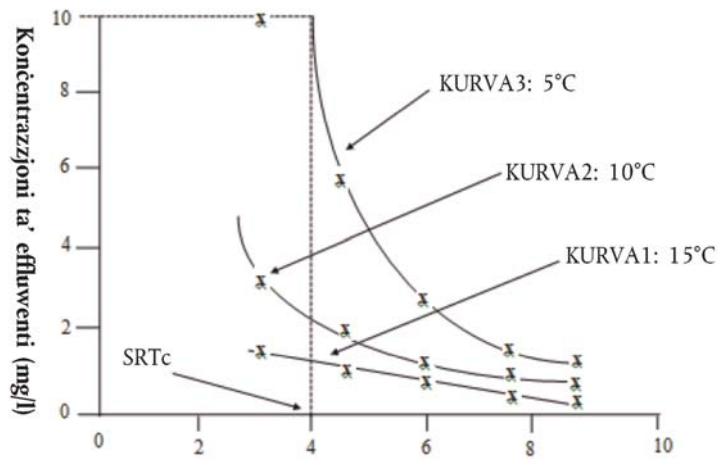
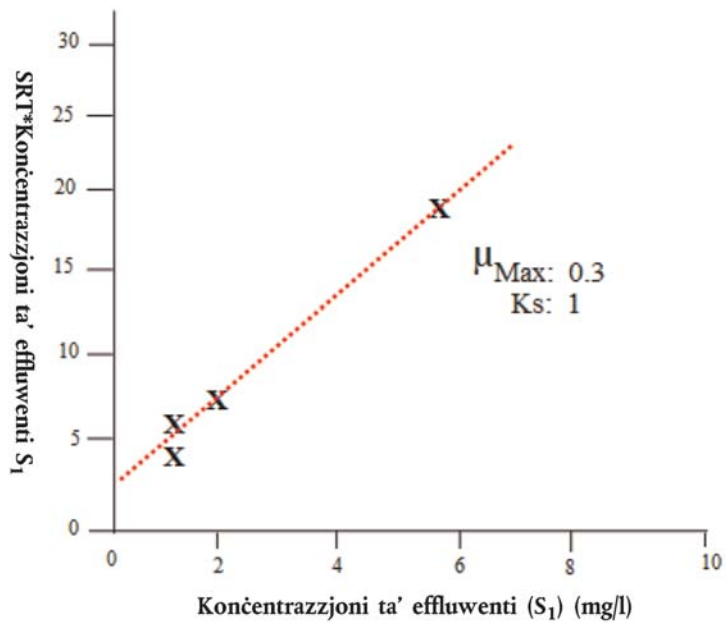


Figura 2

Linja ta' Rigrressjoni SRT S_1 vs S_1 fuq $T = 5^\circ\text{C}$ 

Glossarju:

Konċentrazzjoni ta' effluventi:

Kurva:

▼M4

Appendiċi 7

TEST F'FIRXA TA' ($\mu\text{g/l}$) KONĊENTRAZZJONI BAXXA

1. Hafna kimiċi normalment ikunu jinsabu fl-ambjent akwatiku, f'ilmijiet mormija wkoll, f'konċentrazzjonijiet baxxi hafna ($\mu\text{g/l}$). F'konċentrazzjonijiet bħal dawn probabbli li dawn ma jservux bħala substrati primarji li jirrizultaw fi tkabbir, iżda x'aktarx li jiddegradaw f'substrati sekondarji, minghajr tkabbir, fl-istess żmien ma' varjetà ta' kimiċi tal-karbonju li jseħhu b'mod naturali. Għaldaqstant id-degradazzjonijiet ta' kimiċi bħal dawn ma jkunux jaqblu mal-mudell deskritt fl-Appendiċi 6. Hemm hafna mudelli li jistgħu jkunu applikati u, skont il-kondizzjonijiet li jkun hemm f'sistemi ta' trattament ta' ilma mormi, aktar minn wiehed jista' jkun simultanjamment operattiv. Tkun meħtieġa hafna 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 ($< 100 \mu\text{g/l}$) 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'dranagġ sintetiku f'5 sa $100 \mu\text{g/l}$. (Għall-ahħar bijodegradabbiltà l-kimiċi għall-ittestjar bit-tikketta ^{14}C jistgħu jintużaw. Deskrizzjoni ta' dan tmur lil hinn mill-kamp ta' applikazzjoni ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar minhabba 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' hama attivat nofsu kontinwu (SCAS) ikun segwit minn testijiet kinetiċi għal żmien qasir fuq kampjuni meħudin minn unitajiet ta' SCAS. Is-sistema SCAS tithaddem b'rati ta' rimi ta' hama magħrufin (mhux bħal metodu oriġinali tat-test C.12) u jiddaħhlilha dranaġġ sintetiku tal-OECD modifikat jew dranaġġ domestiku. Id-dranaġġ sintetiku kien immodifikat (minhabba bdil fil-valur tal-pH u hama bi ftit sedimentazzjoni) biż-żieda ta' fosfat bħala lqugh, estratt ta' hmira, klorur tal-hadid (III) u traċċa ta' element ta' melh u COD tiegħu miżjud għal madwar 750 mg/l billi żdiedet il-konċentrazzjoni ta' peptun u estratt tal-laħam. L-unitajiet thaddmu f'ċiklu ta' 24 siegħa: tirwih għal 23 siegħa, rimi ta' hama, sedimentazzjoni, rtirar ta' supernatant (effluwent) u kien segwit b'żieda ta' dranaġġ sintetiku flimkien ma' kimika għall-ittestjar, sa $100 \mu\text{g/l}$, (jiġifieri f'madwar l-istess konċentrazzjoni użata fit-test għal żmien qasir). Darba fil-ġimgha 10 % tat-total ta' hama nbidel b'hama frisk biex tinzamm massa mikrobika bilanċjata.
4. Il-konċentrazzjonijiet ta' kimika għall-ittestjar jitkejlu fil-bidu u fi tmiem tirwih u t-test jitkompla sakemm tinkiseb tneħħija kostanti ta' kimika għall-ittestjar; dan jiehu minn ġimgha 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'hama attivata ta' oriġinijiet u stejjer magħrufin iżda differenti. B'mod partikolari, jittieħdu kampjuni ta' hama mir-reatturi ta' SCAS fit-tmiem ta' perjodu ta' tirwih meta l-konċentrazzjoni ta' substrat organiku tkun baxxa - matul il-perkors ta' esperiment ta' akklimatazzjoni (paragrafi 3, 4). Hama jista' jittieħed ukoll minn unità parallela ta' SCAS li ma tkunx

▼ **M4**

esposta għall-kimika għall-ittestjar, biex jitqabbel. Tahlitiet ta' hama u l-kimika għall-ittestjar miżjuda f'żewġ konċentrazzjonijiet jew aktar fil-firxa 1-50 µg/l jitrewħu, mingħajr ma jizdied 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' tnehhija ta' kimika għall-ittestjar (paragrafu 54). Kostant ta' rata medja, K_1 , (innormalizzat għal konċentrazzjoni ta' solidi sospiżi) jista' wkoll ikun ikkalkulat minn:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

fejn:

t = hin ta' tirwih (23h)

C_e = konċentrazzjoni fi tmiem ta' perjodu ta' tirwih (µg/l)

C_i = konċentrazzjoni fil-bidu ta' tirwih (µg/l)

SS = konċentrazzjoni ta' solidi ta' hama attivati (g/l)

7. Fit-test għal żmien qasir il-konċentrazzjoni log % li jifdal tkun immarkata skont il-hin, u l-anglu tal-parti tal-bidu (10-50 % degradazzjoni) tal-grafika jkun ekwivalenti għal K_1 , il-kostant tal-ewwel grad (pseud). Il-kostant ikun innormalizzat fir-rigward tal-konċentrazzjoni ta' solidi ta' hama billi l-anglu jkun diviż bil-konċentrazzjoni ta' solidi ta' hama. Ir-riżultat irrapportat għandu jinkludi wkoll dettalji ta' konċentrazzjonijiet tal-bidu tal-kimika għall-ittestjar u solidi sospiżi, żmien ta' ritenzjoni ta' hama, tagħbija u sors ta' hama, 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 tohroġ ma ddumx stampa aktar ċara ta' kinetika li topera f'impjanti tat-trattament ta' ilma mormi biex tghin ikun hemm interpretazzjoni aħjar ta' dejta eżistenti, kif ukoll biex tissuggerixxi disinji aktar rilevanti għal Metodi ta' Ttestjar fil-gejjieni.

LETTERATURA:

- (1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.
- (2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼ M4

- (4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and $\mu\text{g/l}$ 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 ($\mu\text{g/l}$ range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Bijoriti

DAHLA

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 jkun għaddew minn test għal bijodegradabbiltà inerenti. B'mod eċċezzjonali t-testijiet ta' simulazzjoni jiġu applikati wkoll għal kwalunkwe kimika li dwarha tkun mehtieġa iktar informazzjoni, speċjalment kimiċi ta' hafna tunnelli, u normalment jiġi applikat it-test tal-hama attivata (C.10 A). F'xi ċirkostanzi, madankollu, tkun mehtieġa informazzjoni speċifika marbuta mal-aġir ta' kimika mal-metodi tat-trattament tal-ilma mormi inkluż bijoriti, l-katar filtri li jnixxu jew li jgħatru, kontatturi bijoloġiċi li jdur, sodod fluwidizzati. Biex din il-mehtieġa tintlaqa' kienu żviluppaw diversi apparati.
2. Gerike *et al.* (1) użaw filtri li jgħatru kbar fuq skala pilota li ġew uttilizzati fil-mudell akkoppjat. Dawn il-filtri kienet għadha spazju u kienu jehtieġu volumi relattivament kbar ta' dranaġġ jew dranaġġ sintetiku. Truesdale *et al.* (2) iddeskrivew filtri iżgħar (6 piedi x 6 pulzieri dijametru) li għaddewhom dranaġġ naturali mingħajr tensjoattivi iżda li x'aktarx kienu għaddhom jehtieġu volumi kbar. Kienu mehtieġa mhux anqas minn 14-il ġimgħa biex kienet żviluppata bijorita "matura" u kienu jehtieġu minn 4 sa 8 ġimgħa oħra wara li ddahhal għall-ewwel darba t-tensjoattiv tat-test qabel ma saret akklimatazzjoni.
3. Baumann *et al.* (3) żviluppaw filtru hafna aktar iżgħar li uża "suf verġni" tal-poliester li qabel kien mgħaddas f'hama attivata 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 kejljiet ta' karbonju organiku mahlul (DOC) fl-influent u fl-effluent, u mill-ammont ta' CO₂ fil-gass li joħroġ.
4. Approċċ pjuttost differenti ittiehdu 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 imdahhal 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 mistgħarra l-aħjar hxuna ta' bijorita u tixrid mir-rita (6). Dawn l-awturi tal-aħjar żviluppaw ulterjorment ir-reattur, inkluż li mmoddifikaw biex ikun jista' jiddetermina CO₂ 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-tossicità ta' ilmiġiet mormija (8). Il-metodu deskritt hawnhekk għandu l-vantaġġi tas-semplicità, il-kompattezza, ir-riproduċibbiltà u l-mehtieġa għal volumi relattivament żgħar ta' midjum organiku.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Dranaġġ sintetiku jew domestiku, u l-kimika għall-ittestjar, f'tahlita jew wahedhom, ikunu applikati fuq il-wiċċ ta' ġewwa ta' tubu inklinat li jdur bil-mod. Saff ta' mikroorganizmi, jixbhu lil dawk li jkun hemm fuq midja ta' bijofiltri, jinbena fuq il-wiċċ ta' ġewwa. Il-kondizzjonijiet ta' thaddim tar-reattur jintgħazlu biex jeliminaw b'mod adegwata materja organika u, jekk ikun mehtieġ, ossidazzjoni tal-ammonju.

▼M4

7. Effluwent mit-tubu jingabar u jew joqgħod u/jew jiġi ffiltrat qabel analizi għal karbonju organiku mahlul (DOC) u/jew għall-kimika għall-ittestjar b'metodu speċifiku. Unitajiet ta' kontroll li ma jirċievu ebda kimika għall-ittestjar jithaddmu 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 minhabba 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 tingharaf minn bijosorbiment b'eżami sewwa tal-kurva ta' eliminazzjoni-żmien/hin. 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 f'it jinhallu ma jistgħux ikunu t-testjati sakemm ma jittehdux 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 mikroorganizmi (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. Originarjament, il-bijodegradazzjoni primarja ta' aġenti tensjoattivi kien jehtigilha tilhaq 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 ingenerali mhux 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 stimuli 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 titwettagħ b'mod korrett, ikun utli kull tant żmien li jkunu ttestjati kimiċi ta' referenza li mgħibthom tkun magħrufa. Kimiċi bħal dawn jinkludu aċidu adipiku, 2-fenil fenol, 1-naftol, aċidu "difeniku" u aċidu 1-naftoiku.

RIŻULTATI RIPRODUĊIBBLI TAT-TESTIJIET

14. Id-devjazzjoni standard relattiva f'testijiet instabet mil-laboratorju fir-Renju Unit li kienet ta' 3,5 % u li bejn testijiet kienet ta' 5 % (7).

▼ **M4****DESKRIZZJONI TAL-METODU****Apparat***Reatturi tubi li jdur*

15. L-apparat (ara l-figuri 1 u 2 fl-Appendiċi 8) jikkonsisti minn sodda ta' tubi tal-akrilik kull wiehied 30,5 cm twil u 5 cm dijametru intern, appoġġat fuq roti tal-lasktu li jkun għo qafas ta appoġġ tal-metall. Kull tubu għandu xoffa, madwar 0,5 cm fonda, biex iżzommu 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 iżzomm il-likwidu. It-tubi huma inklinati f'angolu ta' madwar grad wiehed lejn l-orizzont biex jiksbu l-hin tal-kuntatt mehtieg 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 tigi kkontrollata b'installazzjoni f'kamra li għandha temperatura kostanti.
16. Billi kull reattur tubu jingħalaq għewwa tubu f'tit akbar, bil-għatu u jkun żgurat li ma jkunx jista' jgħorġ gass mill-konnessjonijiet, gass CO₂ li jgħorġ ikun jista' jingħabar f'soluzzjoni ta' alkalina għal kejl sussegwenti (6).
17. Provista ta' 24 siegħa, għal kull tubu, ta' midjum organiku b'kimika għall-ittestjar mizjuda jekk applikabbli, titqiegħed f'reċipjent ta' ħzin (A) ta' 20 l (A) (ara l-Figura 2). Jekk ikun mehtieg, is-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar tista' tigi ddozata separatament. Qrib il-qiegħ ta' kull reċipjent ta' ħzin ikun hemm fetha li tkun ikkunnnettjata b'sistema adatta ta' tubi, eż. lastku tas-silikon, permezz ta' pompa peristaltika (B), ma' tubu ta' hrug magħmul mill-ħgieg jew silikon li jidhol minn 2 sa 4 cm fit-tarf ta' fuq (għalf) tat-tubu inklinat (C). L-effluwent jithalla jgħattar mit-tarf ta' isfel tat-tubu inklinat biex jingħabar f'reċipjent iehor ta' ħzin (D). L-effluwent għandu joqgħod jew ikun iffiltrat qabel analizi.

Apparat ċentrifugu ta' filtrazzjoni

18. Ikun hemm apparat għal filtrazzjoni ta' kampjuni b'filtru ta' membrani ta' porozità adatta (dijametru ta' apertura nominali ta' 0,45 µm) li jassorbi kimiċi organiċi jew li jerhi karbonju organiku għal grad minimu. Jekk jintużaw filtri li jerhu karbonju organiku, aħsilhom sewwa b'ilma shun biex tneħhi karbonju organiku li jliissi. Alternattivament jista' jintuża ċentrifugu li jkun kapaċi jagħmel 40 000 m/sec².
19. Tagħmir analitiku biex ikun iddeterminat:
 - DOC/karbonju organiku totali (TOC) jew domanda kimika ta' ossiġnu (COD);
 - kimika speċifika (HPLC, GC, eċċ.) jekk tkun mehtieġa;
 - pH, temperatura, aċidità, alkalinità;
 - ammonju, nitrit, nitrat, jekk it-testijiet isiru f'kondizzjonijiet ta' nitrifikazzjoni.

Ilma

20. Ilma tal-vit, li jkun fih anqas minn 3 mg/l DOC.
21. Ilma distillat jew dejonizzat, li jkun fih anqas minn 2 mg/l DOC.

▼ **M4***Midjum organiku*

22. Jista' jintuza dranaġġ sintetiku, dranaġġ domestiku jew tahlita tat-tnejn bhala l-midjum organiku. Intwera li l-użu ta' dranaġġ domestiku wahdu sikwit jaghti perċentwali oghla ta' tnehhija ta' DOC (f'unitajiet ta' hama attivati) u jhalli wkoll li jkun hemm bijodegradazzjoni ta' xi kimiċi, li ma jiġux iddegradati bijoloġikament meta jintuza 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' jehtieg li jiżdiedlu lqugh 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' lqugh, u meta għandu jiżdied, għandhom ikunu deċiżi każ każ.

Dranaġġ sintetiku

23. Holl 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 ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 4 mg; sulfat tal-maġniżju eptaidrat ($(Mg_4SO_2 \cdot 7H_2O)$), 2 mg. Dan id-dranaġġ sintetiku tal-OECD huwa eżempju u jaghti konċentrazzjoni medja tad-DOC fl-influent ta' madwar 100 mg/l. Alternattivament, uza 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 issuggerit xejn aħjar, hlief li jiżdied aktar fosfat bhala lqugh u peptun żejjed).

Dranaġġ domestiku

24. Uza dranaġġ qiegħed frisk miġbur kuljum minn xoghlijiet ta' trattament li jirċievu b'mod predominanti dranaġġ domestiku. Dan għandu jingabar mill-kanal tat-tifwir tat-tank ta' sedimentazzjoni primarja, jew mill-ghalf għall-impjant tal-hama attivati, u jkun kważi kollu hieles minn partiċelli raffi. Id-dranaġġ ikun jista' jintuza wara l-ħzin 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 ħzin. 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. Jistghu jintużaw glicerol jew żejt taż-żebuga għal-lubrikazzjoni tar-rombli tal-pompa peristaltika: it-tnejn huma tajbin biex jintużaw fuq tubi tal-lastku tas-silikon.

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' kimika għall-ittestjar

26. Għal kimiċi li jinhallu b'mod adegwat hejji 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 jinhallux, 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-kejljiet għal kull lott ġdid. Jekk id-differenza bejn DOC u TOC tkun aktar minn 20 %, iwwerifika jekk il-kimika għall-ittestjar tinhallx fl-ilma. Qabbel DOC jew il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar imkejla b'analizi speċifika tas-soluzzjoni ta'

▼ M4

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' analizi speċifika.

27. Iddetermina pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Valuri estremi jindikaw li ż-żieda tal-kimika jista' jkollha influwenza fuq pH tal-hama attivata fis-sistema ta' ttestjar. F'dan il-każ innewtralizza s-soluzzjoni ta' stokkijiet biex tikseb pH ta' $7 \pm 0,5$ b'ammonti żgħira ta' aċidu jew bażi inorganici, iżda evita l-precipitazzjoni tal-kimika għall-ittestjar.

PROCEDURA

Thejjiġa 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 tneħhi tkabbir mikrobiku, fil-bidu u matul it-test kollu.
29. Hejji d-dranaggj sintetiku (paragrafu 23) frisk kuljum mis-solidi jew mis-soluzzjoni koncentrata ta' stokkijiet b'dilwizzjoni adatta b'ilma tal-vit. Kejjel l-ammont meħtieġ f'ċilindru u žid f'reċipjent nadif ta' influenti. Jekk ikun meħtieġ, žid ukoll l-ammont meħtieġ tas-soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika għall-ittestjar jew tal-kimika ta' referenza mad-dranaggj sintetiku qabel id-dilwizzjoni. Jekk ikun aktar konvenjenti jew ta' hteġa biex ikun evitat telf tal-kimika għall-ittestjar, hejji soluzzjoni separata dilwita tal-kimika għall-ittestjar f'riżerva separata u għaddi din fit-tubi inklinati permezz ta' pompa differenti tad-dożaggj.
30. Alternattivament (u preferibbilment), uża dranaġġ qiegħed domestiku (paragrafu 24) miġbur frisk kuljum jekk ikun possibbli.

Thaddim ta' reatturi tubi li jduru

31. Ikunu meħtieġa żewġ reatturi tubi identiċi għall-valutazzjoni ta' kimika waħda ta' ttestjar, u jitgħaqqu f'kamra b'temperatura kostanti normalment ta' 22 ± 2 °C.
32. Aġġusta l-pompi peristaltici 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-hajja tas-sistema tat-tubi.
33. Aġġusta l-angolu tax-xaqliba tat-tubi mal-orizzontali biex tipproduci żmien ta' residenza ta' $125 \pm 12,5$ kull sekonda għall-ghalf f'tubu nadif. Aghmel stima taż-żmien ta' ritenzjoni billi żżid marka mhux bijoloġika (eż. NaCl, kulurant inerti) lill-ghalf: iż-żmien li l-koncentrazzjoni tiehu biex tilhaq l-aqwa tagħha fl-effluwent jitqies li jkun il-żmien medju ta' ritenzjoni (meta jkun hemm rita massima, iż-żmien ta' ritenzjoni jista' jżided sa madwar 30 minuta).
34. Dawn ir-rati, veloċitajiet u hinijiet instabu li jneħhu b'mod adegwat (> 80 %) ta' DOC (jew ta' COD) u li jipproducu effluwenti nitrifikati. Ir-rata ta' fluss għandha tinbidel jekk tneħhija ma tkunx suffiċjenti jew jekk il-prestazzjoni ta' impjant partikolari ta' trattament ikollha tkun issimulata. F'dan il-każ tal-aħħar, aġġusta r-rata ta' dożar tal-midjum organiku sakemm il-prestazzjoni tar-reattur tkun taqbel ma' dik tal-impjant ta' trattament.

▼ **M4***Tilqim*

35. Tilqim li jingarr mal-arja jista' jkun suffiċjenti biex jinbeda t-tkabbir ta' mikroorganizmi meta jintuza dranaġġ sintetiku, izda minbarra dak zid 1 ml/l ta' dranaġġ qiegħed mal-ghalf għal 3 ijiem.

Kejl

36. F'intervalli regolari ara li r-rati ta' doża u l-voloċitajiet ta' tidwir ikunu fil-limiti mehtieġa. Kejjel ukoll il-pH tal-effluwent, l-aktar jekk tkun mistennija nitrifikazzjoni.

Tehid ta' kampjuni u analiżi

37. Il-metodu, xejra u frekwenza ta' tehid ta' kampjuni jintgħazlu biex ikunu adatti għall-fini tat-test. Pereżempju, hu 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, hu kampjuni darbtejn fil-gimgha. Iffiltra l-kampjuni minn membrani jew ċentrifugu f'madwar 40 000 m/sec² għal madwar 15-il minuta (paragrafu 18). Jista' jkun hemm il-htieġa 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 mehtieġ, BOD, ammonju u nitrit/nitrat.
38. Kull analiżi għandha ssir malajr kemm jista' jkun wara l-ġbir u t-thejjija tal-kampjuni. Jekk analiżi jkollha tiġi posposta, aħżen il-kampjuni f'madwar 4 °C fid-dlam fi flieken mimlijin u magħluqin issikkati. Jekk kampjuni jkollhom jinħażnu għal aktar minn 48 siegħa, ippreservahom fil-friza, b'acidifikazzjoni jew biż-zieda 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-rizultati ta' analiżi.

Perjodu tal-bidu (running-in)

39. F'dan il-perjodu, il-bijorita tal-wiċċ tikber biex tilhaq l-aħjar hxuna, li s-soltu tiehu madwar gimmagħtejn u m'għandhiex tiehu aktar minn 6 gimghat. It-tnehhija (paragrafu 44) ta' DOC (jew ta' COD) tizdied u tilhaq valur ta' livell kostanti. Meta l-faži 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.

Dhul ta' kimika għall-ittestjar

40. F'dan l-istadju zied il-kimika għall-ittestjar mar-reattur l-iehor fil-koncentrazzjoni mehtieġa, normalment 10-20 mg C/l. Il-kontroll ikompli jirċievi l-midjum organiku wahdu.

Perjodu ta' akklimatazzjoni

41. Kompli bl-analiżi darbtejn fil-gimgha għal DOC (jew COD) u, jekk ikollha tkun ivvalutata l-bijodegradabbiltà primarja, kejjel ukoll il-koncentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar b'analiżi speċifika. Halli minn gimgha sa sitt gimghat (jew aktar f'kondizzjonijiet speċjali) wara li l-kimika għall-ittestjar tkun iddahhlet għall-ewwel darba biex issehh akklimatazzjoni. Meta l-percentwali ta' tnehhija (paragrafi 43-45) jilhaq valur massimu, ikseb valuri validi minn 12-15 fil-faži ta' livell kostanti tul madwar 3 gimghat għal evalwazzjoni tal-percentwali medja ta' tnehhija. It-test jitqies lest jekk jintlaħaq grad għoli biżżejjed ta' eliminazzjoni. Normalment, taqbiżx żmien ta' 12-il gimgha ta' kemm idum test wara l-ewwel zieda tal-kimika għall-ittestjar.

▼M4*Ħrif tar-rita*

42. It-tnehhija f'daqqa ta' kwantitajiet kbar ta' rita żejda mit-tubi, jew ħrif, issehh relattivament f'intervalli regolari. Biex tiżgura li ma tkunx affettwata l-komparabbiltà ta' riżultati, halli t-testijiet ikopru mill-anqas żewġ ċikli kbar ta' tkabbir u ħrif.

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament ta' riżultati**

43. Ikkalkula l-perċentwali ta' eliminazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) tal-kimika għall-ittestjar għal kull valutazzjoni li jkun ittehdilha l-hin 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'hin t ;

C_s = konċentrazzjoni ta' DOC (jew ta' COD) fl-influent minhabba 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-effluent tat-test f'hin t (mg/l);

E_o = DOC (jew COD) mkejla fl-effluent tal-kontroll f'hin 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

C_m = DOC (jew COD) tal-midjum organiku fl-influent tal-kontroll (mg/l).

45. Ikkalkula t-tnehhija (D_{ST}) tal-kimika għall-ittestjar, jekk titkejjel, b'metodu analitiku speċifiku f'valutazzjoni ta' kull darba bl-ekwazzjoni:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e / S_i) \%$$

fejn

S_i = konċentrazzjoni mkejla jew, preferibbilment, stmata ta' kimika għall-ittestjar fl-influent tat-test (mg/l)

S_e = konċentrazzjoni mkejla tal-kimika għall-ittestjar fl-effluent tat-test f'hin t (mg/l)

▼ M4

Jekk il-metodu analitiku jagħti valur pożittiv f'ekwivalenti ta' dranaġġ mhux mibdul għal S_c mg/l, ikkalkula l-perċentwali ta' tnehhija (D_{SC}) minn:

$$DSC = 100 (S_i - S_e + S_c) / (S_i + S_c) \%$$

Espressjoni ta' riżultati tat-testijiet

46. Immarka l-perċentwali ta' eliminazzjoni D_t u D_{ST} (jew D_{SC}), jekk ikunu disponibbli, kontra l-hin (ara l-Appendiċi 2 fil-Kapitolu C.10- A). Hu l-medja (espressa sal-eqreb numru shih) 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 bhala l-perċentwali ta' tnehhija tal-kimika għall-ittestjar. Mill-forma tal-kurva ta' eliminazzjoni, jistgħu jinstiltu xi konklużjonijiet dwar il-proċessi ta' tnehhija.

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' determinazzjoni tal-kimika għall-ittestjar assorbita fuq solidi hrif 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' tnehhija li bil-mod il-mod jinżel għal valur ta' ekwilibriju. Izda jekk il-kimika għall-ittestjar assorbita setgħet ikkawżat akklimatazzjoni tal-massa mikrobika, l-eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar DOC sussegwentement għandha tiżdied u tilhaq livell kostanti għoli.

Fażi ta' intervalli

48. Bhal f'dawk statiči, f'testijiet ta' tgharbil hafna kimiċi għall-ittestjar jehtieġu fażi ta' intervalli qabel ma ssehh bijodegradazzjoni shiha. Fil-fażi ta' intervalli, akklimatazzjoni (jew adattament) tal-batterja kompetenti ssehh minghajr ma kwazi titneħħa l-kimika għall-ittestjar; mbagħad issehh 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 issehh). Il-fażi ta' intervalli sikwit tkun varjabbli hafna u bilkemm riproduttibbli.

Fażi ta' livell kostanti

49. Il-fażi ta' livell kostanti ta' kurva ta' eliminazzjoni f'test kontinwu hija ddefinita bhala dik il-fażi li fiha ssehh id-degradazzjoni massima. Din il-fażi għandha ddum mill-anqas 3 ġimgħat u jkollha madwar 12-15-il valur validu mkejjejl.

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 shih (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-riċipjent ta' kontroll.

▼ **M4****Indikazzjoni ta' bijodegradazzjoni**

51. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tassorbix b'mod sinifikanti mill-bijorita u l-kurva ta' eliminazzjoni jkollha forma tipika ta' kurva ta' bijodegradazzjoni b'intervall, ta' fażijiet ta' degradazzjoni u ta' livell kostanti (paragrafi 48, 49), l-eliminazzjoni mkejlja 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 aghmel testijiet statiči addizzjonali (tgharbil) għall-bijodegradabbiltà ibbazati 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' CO₂ (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 jkun 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 jkun aktar diffiċli li jiddegradaw; dawn għandhom ikun mistharka.

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' thaddim u ma tkun saret ebda osservazzjoni mhux tas-soltu.
54. Jekk kimika (ta' referenza) bijodegradabbli faċilment tkun giet 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 jitharsux, 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 jitrattaw kimika għall-ittestjar m'għandhomx ikunu differenti b'aktar minn 5 %. Jekk dan il-kriterju ma jitharisx iżda t-tneħħija tkun għolja, kompli bl-analizi għal tliet ġimgħat oħra. Jekk it-tneħħija tkun baxxa, stharreġ 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 fizika u, fejn ikun rilevanti, proprjetajiet fizikokimiċi.

Kondizzjonijiet tat-test:

- kull modifika għas-sistema ta' ttestjar, l-aktar jekk ikunu ttestjati kimiċi li ma jinhallux jew ikunu volatili;
- tip ta' midjum organiku;
- proporzjon u natura ta' skart industrijali fid-dranaġġ, jekk jintużaw u jekk ikunu magħrufa;
- metodu ta' tilqim;

▼ **M4**

- soluzzjoni ta' stokkijiet ta' kimiċi għall-ittestjar – kontenut ta' DOC (karbonju organiku mahlul) u TOC (karbonju organiku totali); kif tithejja, jekk ta' sospensjoni; konċentrazzjoni(jiet) użata/i tat-test, raġunijiet jekk ikunu 'l barra mill-firxa 10-20 mg/l DOC; metodu ta' zieda; data tal-ewwel zieda; kull bidla fil-konċentrazzjoni;
- hin medju ta' retenzjoni idrawlika (b'ebda tkabbir); veloċità ta' rotazzjoni tat-tubu; angolu approssimattiv tax-xaqliba, jekk ikun possibbli;
- dettalji ta' hrif; hin u intensità;
- temperatura tat-test u firxa;
- tekniċi analitiċi użati.

Riżultati tat-testijiet:

- dejta mkejla kollha ta' DOC, COD, analiżi speċifika, pH, temperatura, kimiċi N, jekk rilevanti;
- id-dejta kollha kkalkolata ta' D_t (jew D_{tc}), D_B , D_{St} miksuba f'forma tabulari u l-kurvi ta' eliminazzjoni;
- informazzjoni dwar fażijiet ta' intervalli u ta' livelli kostanti, durata ta' testijiet, il-grad ta' eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar, tal-kimika ta' referenza (jekk ittestjata) u tal-midjum organiku (fl-unità ta' kontroll), flimkien ma' dejta ta' statistika u dikjarazzjonijiet dwar il-bijodegradabbiltà u l-validità tat-test;
- diskussjoni dwar ir-riżultati.

LETTERATURA:

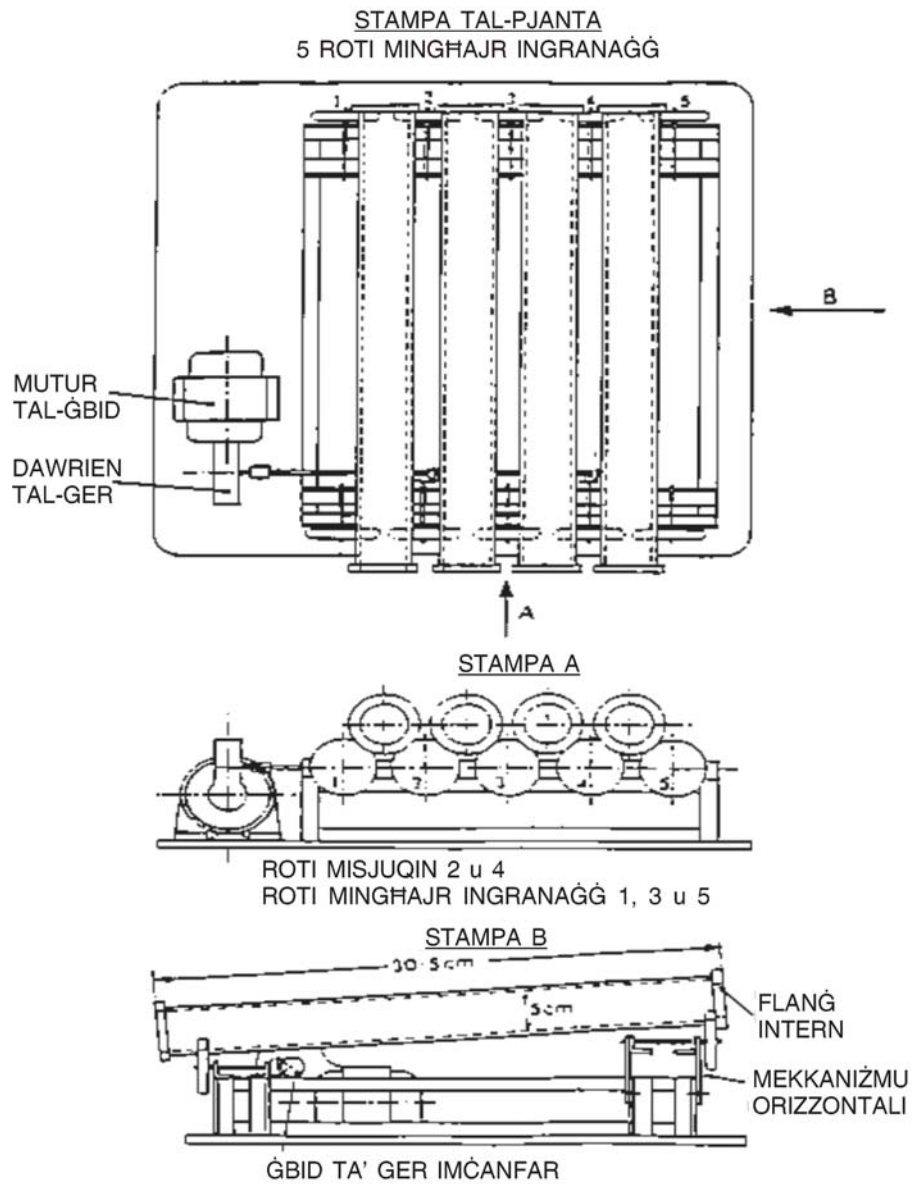
- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
- (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.
- (3) Baumann U, Kuhn G u Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
- (5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92-94.
- (6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
- (9) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, Determinazzjoni ta' Bijodegradabbiltà "Faċli" A-F.
- (10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼ **M4**

Appendiċi 8

Figura 1

Tubi li jduru

*Glossarju:*

Stampa tal-pjanta:

Stampa A/B:

Roti misjuqin:

Roti minghajr ingranagġ:

Mutur tal-ġbid:

Dawrien tal-ger:

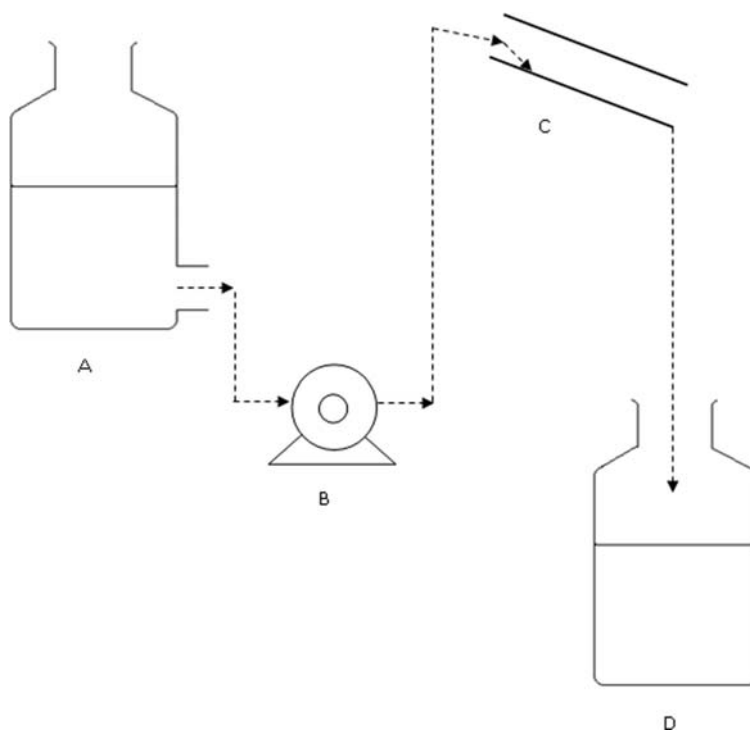
Flanġ intern:

Mekkanizmu orizzontali:

Ġbid ta' ger imċanfar:

▼ **M4**

Figura 2
Dijagramma ta' fluss



A: Tank tal-Għalf

B: Pompa Peristaltika

C: Tubu li Jdur

D: Reċipjent għal Ġbir ta' Effluwenti

DEFINIZZJONIJIET:

Kimika għall-ittestjar: Kull sustanza jew tahlita 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, tahlitiet, thejjijiet, jew kull frażi oħra li tista' tintuża f'sistemi eżistenti biex jindikaw "kopertura"."

▼ M6

C.11. HAMA ATTIVATA, TEST TAL-INIBIZZJONI RESPIRATORJA
(KARBONJU U OSSIDAZZJONI TAL-AMMONIJAKA)

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 209 tal-OECD (2010) Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi metodu biex jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika fuq il-mikro-organizmi minn hama attivata (fil-biċċa l-kbira batterji) billi titkejjel ir-rata ta' respirazzjoni tagħhom (karbonju u/jew ossidazzjoni tal-ammonju) f'kundizzjonijiet iddefiniti fil-preżenza ta' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test. Il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq it-test ETAD (1) (2) (Assoċjazzjoni Ekoloġika u Tossikoloġika tal-industrija tal-Manifattura tas-Sustanzi taż-Żebgħa), fuq l-OECD TG 209 preċedenti (3) u fuq l-Istandard ISO rivedut 8192 (4). L-iskop tat-test huwa li jipprovi metodu ta' skrinjar rapidu biex jivvaluta l-effetti tas-sustanzi kimiċi fuq il-mikro-organizmi tal-hama attivata tal-istadju (aerobiku) bijoloġiku tal-impjanti tat-trattament tal-ilma mormi. Ir-riżultati tat-test jistgħu jservu wkoll bħala indikatur ta' konċentrazzjonijiet mhux inibitorji xierqa tas-sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jintużaw fit-testijiet tal-bijodegradabbiltà (perzempju Kapitoli C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 u C.29 ta' dan l-Anness, OECD TG302C). F'dan il-każ, it-test jista' jidwettaq bħala test tal-iskrinjar, b'mod simili għas-sejba tal-medda jew it-test tal-limitu (ara l-paragrafu 39), li jikkunsidra r-respirazzjoni globali biss. Madankollu, din l-informazzjoni għandha titqies b'attenzjoni għal testijiet tal-bijodegradabbiltà lesti (Kapitolu C.4 A-F u C.29 ta' dan l-Anness) għal liema l-konċentrazzjoni tal-inokulu hija sinifikament inqas minn dik użata f'dan il-metodu ta' ttestjar. Fil-fatt, nuqqas ta' inibizzjoni f'dan it-test tar-respirazzjoni mhux bilfors jirriżulta f'kundizzjonijiet mhux inibitorji fit-test tal-bijodegradabbiltà faċli tal-Kapitolu C.4 A-F jew C.29 ta' dan l-Anness.
2. B'mod ġenerali, l-inibizzjoni tar-respirazzjoni tidher li giet applikata b'suċċess minn mindu giet applikata l-ewwel, iżda f'xi okkażjonijiet għew irrapportati riżultati foloz, eż. (2) (4) (5). Kurvi ta' respirazzjoni relatati mal-konċentrazzjoni xi drabi jkunu maqsumin f'żewġ fażijiet, il-plotts ta' dożarrespons tgħawgu u l-valuri EC₅₀ kienu baxxi b'mod mhux mistenni (5). L-investigazzjonijiet urew li tali riżultati jinkisbu meta l-hama attivata użata fit-test tinnitrifika b'mod sinifikanti u s-sustanza kimika tat-test għandha effett ikbar fuq l-ossidazzjoni tal-ammonju milli fuq l-ossidazzjoni eterotrofica ġenerali. Għalhekk, dawn ir-riżultati foloz jistgħu jingħelbu billi jsir ittestjar addizzjonali permezz ta' inibitur speċifiku tan-nitrifikazzjoni. Bil-kejl tar-rati ta' tehid tal-ossiġenu fil-preżenza u n-nuqqas ta' tali inibitur, eż. N-alliltjorea (ATU), jistgħu jiġu kkalkolati r-rati ta' tehid tal-ossiġenu eterotrofiku u ta' nitrifikazzjoni separat totali (4) (7) (8). Għalhekk, l-effetti inibitorji ta' sustanza kimika tat-test fuq iż-żewġ proċessi jistgħu jiġu ddeterminati u l-valuri EC₅₀ kemm għall-ossidazzjoni tal-karbonju organiku (eterotrofika) kif ukoll l-ossidazzjoni tal-ammonijaka (nitrifikazzjoni) jistgħu jiġu kkalkolati bħas-soltu. Ta' min jinnota li f'xi każijiet rari, l-effett inibitorju ta' N-alliltjorea jista' jithassar parzjalment jew kompletament bħala riżultat tal-kompleksazzjoni mas-sustanzi kimiċi tat-test jew is-supplimenti tal-midjum, eż. joni Cu⁺⁺ (6). Il-ioni Cu⁺⁺ huma essenzjali għal *Nitrosomonas*, iżda huma tossiċi f'konċentrazzjoni oghla.
3. Il-htieġa għal nitrifikazzjoni fit-trattament ajrobiku tal-ilmijiet mormija, bħala pass mehtieġ fil-proċess ta' tnehhija tal-komposti tan-nitroġenu mill-ilmijiet mormija b'denitrifikazzjoni għall-prodotti gassużi, saret urġenti b'mod partikolari fil-pajjiżi Ewropej; l-UE issa stabbilixxiet limiti iktar baxxi għall-konċentrazzjoni ta' nitroġenu fl-effluwenti trattati skarikati fl-ilmijiet riċeventi.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Id-Direttiva tal-Kunsill 91/271/KEE tal-21 ta' Mejju 1991 dwar it-trattament ta' l-ilma urban mormi. ĠU L 135, 30.5.1991, p. 40

▼ **M6**

4. Għall-bieċa l-kbira tal-kazijiet, il-metodu biex jiġi vvalutat l-effett fuq il-proċessi ta' ossidazzjoni tal-karbonju organiku wahdu huwa biżżejjed. Madankollu, f'xi każijiet tkun meħtieġa eżaminazzjoni tal-effett fuq in-nitrifikazzjoni wahda, jew kemm fuq in-nitrifikazzjoni kif ukoll fuq l-ossidazzjoni tal-karbonju organiku b'mod separat, għall-interpretazzjoni tar-riżultati u l-fehim tal-effetti.

PRINCIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

5. Ir-rati ta' respirazzjoni tal-kampjuni ta' hama attivata mogħtija drenagg' sintetiku jitkejlu f'ċellola magħluqa li fiha elettrodu tal-ossigenu wara hin ta' kuntatt ta' 3 sigħat. B'kunsiderazzjoni tax-xenarju ta' espożizzjoni realistiku, jaf ikunu xierqa żminijiet ta' kuntatt itwal. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi degradata malajr, eż. b'mod abiotiku permezz ta' idrolisi, jew hija volatilili u l-konċentrazzjoni ma tistax tinżamm b'mod adegwat, jista' jintuża perjodu ta' espożizzjoni addizzjonali iqsar ta' eż. 30 minuta. Is-sensittività ta' kull lott ta' hama attivata għandha tiġi vverifikata b'sustanza kimika ta' referenza xierqa fil-jum tal-espożizzjoni. It-test ġeneralment jintuża biex jiddetermina l-EC_x (eż. EC₅₀) tas-sustanza kimika tat-test u/jew il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).
6. L-inibizzjoni tat-teħid tal-ossigenu minn mikro-organizmi li jossidaw il-karbonju organiku tista' tkun espressa b'mod separat minn dik minn mikro-organizmi li jossidaw l-ammonju permezz tal-kejl tar-rati ta' teħid ta' ossigenu fin-nuqqas u l-preżenza ta' N-alliltjourea, inibitur speċifiku tal-ossidazzjoni tal-ammonju għan-nitrit mill-batterji nitrifikanti tal-ewwel stadju. F'dan il-każ, il-perċentwal ta' inibizzjoni tar-rata ta' teħid ta' ossigenu huwa kkalkolat bi tqabbil tar-rata ta' teħid ta' ossigenu fil-preżenza ta' sustanza kimika tat-test bir-rata ta' teħid tal-ossigenu medja tal-kontrolli korrispondenti li ma fihom ebda sustanza kimika tat-test, kemm fil-preżenza kif ukoll fin-nuqqas tal-inibitur speċifiku, N-alliltjourea.
7. Kwalunkwe teħid ta' ossigenu li jirriżulta minn proċessi abijotiċi jista' jiġi skopert billi tiġi ddeterminata r-rata fit-tahlitiet tas-sustanza kimika tat-test, il-midjum tad-drenagg' sintetiku u l-ilma, filwaqt li tithalla barra l-hama attivata.

INFORMAZZJONI TAS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

8. L-identifikazzjoni (idealment in-numru CAS), l-isem (IUPAC), il-purita, is-solubbiltà fl-ilma, il-pessjoni tal-fwar, il-volatilità u l-karatteristiċi tal-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu magħrufa biex issir l-interpretazzjoni korretta tar-riżultati. Normalment, is-sustanzi kimiki volatilili ma jistgħux jiġu ttestjati b'mod adegwat sakemm ma jittiddux prekawzzjonijiet speċjali (ara l-paragrafu 21).

APPLIKABILITÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

9. Il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi applikat għal sustanzi kimiċi li jinhallu fl-ilma, li ma tantx jinhallu u sustanzi kimiċi volatilili. Madankollu, mhux dejjem jaf ikun possibbli li jinkisbu valuri EC₅₀ b'sustanzi kimiċi ta' solubbiltà limitata u riżultati validi b'sustanzi kimiċi volatilili jistgħu jinkisbu biss sakemm il-bieċa l-kbira (xi > 80 %) tas-sustanza kimika tat-test tibqa' fit-tahlita tar-reazzjoni fi tmiem il-perjodu/perjodi ta' espożizzjoni. Għandha tiġi sottomessa dejta ta' appoġġ analitika addizzjonali biex tiġi rfinata l-konċentrazzjoni EC_x meta jkun hemm xi incertezza dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test jew il-volatilità tagħha.

▼ **M6****SUSTANZI KIMIČI TA' REFERENZA**

10. Is-sustanzi kimiċi ta' referenza għandhom jiġu ttestjati perjodikament sabiex jiġi żgurat li l-metodu ta' ttestjar u l-kundizzjonijiet tat-test huma affidabbli, u biex tiġi ċċekkjata s-sensittività ta' kull lott ta' hama attivata użata bħala inokulu mikrobjali dakinhar tal-espożizzjoni. Is-sustanza kimika 3,5-diklorofenol (3,5-DCP) hija rakkomandata bħala s-sustanza kimika inibitorja ta' referenza, peress li hija inibitur magħruf tar-respirazzjoni u tintuża f'diversi tipi ta' test għal inibizzjoni/tossiċità (4). Jista' jintuża wkoll sulfat tar-ram (II) pentaidrat bħala sustanza kimika ta' referenza għall-inibizzjoni tar-respirazzjoni totali (9). N-metilanilina tista' tintuża bħala inibitur ta' nitrifikazzjoni ta' referenza speċifiku (4).

KRITERJI TA' VALIDITÀ U RIPRODUĊIBILTÀ

11. Ir-rata ta' tehid tal-ossigenu b'kontrolli inbjank (mingħajr is-sustanza kimika tat-test jew is-sustanza kimika ta' referenza) ma għandhiex tkun inqas minn 20 mg ossigenu għal kull gramma hama attivata (piż xott ta' solidi sospiżi) f'siegha. Jekk ir-rata hija inqas, it-test għandu jiġi ripetut b'hama attivata mahsula jew mill-hama minn sors iehor. Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-rata ta' tehid tal-ossigenu fir-repliki ta' kontroll ma għandux ikun iktar ta' 30 % fi tmiem it-test finali.
12. F'ring test internazzjonali tal-2004 organizzat mill-ISO (4) permezz ta' hama attivata derivata minn drenagġ domestiku, instab li l-EC₅₀ ta' 3,5-DCP hija fil-medda ta' 2 mg/l sa 25 mg/l għar-respirazzjoni totali, 5 mg/l sa 40 mg/l għal respirazzjoni eterotropika u 0,1 mg/l sa 10 mg/l għal respirazzjoni ta' nitrifikazzjoni. Jekk l-EC₅₀ ta' 3,5-DCP ma taqax fil-medda mistennija, it-test għandu jiġi ripetut b'hama attivata minn sors iehor. L-EC₅₀ ta' sulfat tar-ram (II) pentaidrat għandha taqa' fil-medda ta' 53-155 mg/l għar-respirazzjoni totali (9).

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR**Reċipjenti u apparat tal-ittestjar**

13. Għandu jintuża t-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dawn li ġejjin:
 - (a) Reċipjenti tat-test — pereżempju, bekkijiet ta' 1 000 ml biex ikun fihom 500 ml tahlita ta' reazzjoni (ara 5 f'Fig.1);
 - (b) Ċelloli u aċċessorji għall-kejl ta' konċentrazzjoni ta' ossigenu dissolt; elettrodu tal-ossigenu xieraq; ċellola magħluqa biex tinkludi l-kampjun mingħajr ebda spazju vojta fuqani u registratur (eż. 7, 8, 9 f'Fig.1 tal-Appendiċi 2); inkella, jista' jintuża flixxun BOD bi sleeve adaptor xieraq għall-issigillar tal-elettrodu tal-ossigenu mal-ghonq tal-flixxun (ara Fig. 2 tal-Appendiċi 3). Biex jiġi evitat it-telf ta' likwidu spostat mal-inserzjoni tal-elettrodu tal-ossigenu, huwa rakkomandat li l-ewwel jiddaħhal lembut jew tubu tal-ħġieġ mis-sleeve, jew li jintużaw reċipjenti b'rim-mijiet flared-out. Fiż-żewġ każijiet għandu jintuża hawwad manjetiku jew metodu ta' thawwid alternattiv, eż. sonda awtomatika ta' tahwid;
 - (c) Hawwada manjetiki u segwituri, mġhottijin b'materjali inert, għall-użu f'kompartiment tal-kejl u/jew fir-reċipjenti tat-test;
 - (d) Apparati ta' arjazzjoni: jekk ikun mehtieġ, għandha tingħadda arja kumpressa permezz ta' filtru xieraq biex jitneħħa t-trab u ż-żejt u permezz ta' fliexken tal-ħasil li fihom l-ilma biex tiġi umidifikata

▼ M6

l-arja. Il-kontenuti tar-reċipjenti għandhom jiġu arjati b'pipetti tal-Pasteur, jew apparat ta' arjazzjoni ieħor, li ma jassorbix sustanzi kimiċi. Hawwad orbitali mhaddem f'veloċitajiet orbitanti bejn 150 u 250 rpm bi flasks pereżempju, b'kapaċità ta' 2 000 ml, jistgħu jintużaw biex jissodisfaw id-domanda ta' ossiġenu għall-hama u jingħelbu d-diffikultajiet bis-sustanzi kimiċi li jipproduċu raġġwa eċċessiva, huma volatili u għal-hekk jintilfu, jew huma diffiċli biex tferrixhom meta jiġu arjati bi sparging tal-arja. Is-sistema tat-test hija ġeneralment ta' bekkijiet arjati kontinwament u sekwenzjalment stabbiliti (eż. f'intervalli ta' madwar 10 — 15-il minuta), imbagħad analizzati b'mod sekwenzjali. Tista' tintuża wkoll strumentazzjoni vvalidata li tippermetti l-arjazzjoni simultanja u l-kejl tar-rata ta' konsum tal-ossiġenu fit-tahlitiet;

(e) miter tal-pH;

(f) Iċċentrifuga, ċentrifuga ġenerali ta' fuq il-bank għal hama b'kapaċità ta' 10 000 m/s².

Reaġenti

14. Għandhom jintużaw biss reaġenti bi grad analitiku l-hin kollu.

Ilma

15. Għandu jintuża ilma distillat jew dejonizzat, li fih inqas minn 1 mg/l DOC, hlief meta jkun speċifikat ilma tal-vit mingħajr klorin.

Għalf minn drenaġġ sintetiku

16. Il-midjum għandu jithejja biex ikun fih il-kostitwenti li ġejjin fl-ammonti ddikjarati:

— pepton	16 g
— estratt tal-laħam (jew estratt tal-hxejjex paragunabbli)	11 g
— urea	3 g
— klorur tas-sodju (NaCl)	0,7 g
— diidrat tal-klorur tal-kalċju (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0,4 g
— eptaidrat tas-sulfat tal-magnezju, (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,2 g
— anhydrous potassium monohydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	2,8g
— ilma distillat jew dejonizzat sa litru	

17. Il-pH ta' din is-soluzzjoni għandu jkun ta' $7,5 \pm 0,5$. Jekk il-midjum imhejji ma jintużax mill-ewwel, dan għandu jinħażen fid-dlam f'0 °C sa 4 °C, għal mhux iktar minn ġimgħa jew f'kundizzjonijiet, li ma jibdlux il-kompożizzjoni tiegħu. Ta' min jinnota li dan id-drenaġġ sintetiku huwa konċentrat ta' 100 darba ta' dak deskritt fir-Rapport Tekniku tal-OECD "Metodu propost għad-determinazzjoni tal-bijodegradabbiltà tas-surfetanti użati fid-deterġenti sintentiċi" 11 ta' Ġunju 1976, b'zieda ta' fosfat tal-idroġenu tad-dipotassju wkoll.

▼ M6

18. Inkella, il-komponenti tal-midjum jistgħu jiġi sterilizzati individwalment qabel il-ħzin, jew il-pepton u l-estratt tal-laħam jistgħu jiżdiedu f'it qabel ma jsir it-test. Qabel l-użu, il-midjum għandu jithallat sew u l-pH aġġustat jekk ikun meħtieġ għal $\text{pH } 7,5 \pm 0,5$.

Sustanza kimika tat-test

19. Għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija għal sustanzi tat-test li jinhallu fl-ilma mill-ewwel sas-solubbiltà massima tal-ilma biss (preċipitazzjonijiet mhumix aċċettabbli). Sustanzi li ma tantx jinhallu fl-ilma, it-tahlitiet b'komponenti ta' solubbiltà fl-ilma differenti u s-sustanzi adsorbivi għandhom jiġu pponderati direttament fir-reċipjenti tat-test. F'dawn il-każijiet, l-użu ta' soluzzjonijiet ewlenin jaf ikun alternattiva jekk il-konċentrazzjonijiet mahlula tas-sustanzi kimiċi tat-test huma analitikament determinati fir-reċipjenti tat-test (qabel tiżdied hama attivata). Jekk jiġu ppreparati frazzjonijiet akkomodati bl-ilma (WAFs), hija essenzjali wkoll determinazzjoni analitika tal-konċentrazzjonijiet mahlula tas-sustanzi kimiċi tat-test fir-reċipjenti tat-test. Għandu jiġi evitat l-użu ta' solventi organiċi, aġenti dispersivi/emulsifikanti biex tittejjeb is-solubbiltà. Ultrasonikazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u sospensjonijiet ta' qabel it-tahlit, eż. ta' matul il-lejl, huwa possibbli meta jkun hemm informazzjoni adegwata disponibbli dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test f'tali kundizzjonijiet.
20. Is-sustanza kimika tat-test tista' taffettwa hażin il-pH fi hdan is-sistema tal-ittestjar. Il-pH tat-tahlitiet ittrattati bis-sustanza kimika tat-test għandu jiġi ddeterminat qabel il-konfigurazzjoni tat-test, fi prova preliminari, biex jiġi aċċertat jekk ikunx meħtieġ aġġustament tal-pH qabel it-test ewleni u anki dakinhar tat-test ewleni. Soluzzjonijiet/sospensjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma għandhom jiġu newtralizzati qabel iż-żieda tal-inokulu, jekk ikun meħtieġ. Madankollu, peress li n-newtralizzazzjoni tista' tibdel il-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika, jista' jsir iktar ittestjar, skont il-finijiet tal-istudju, biex jiġi vvalutat l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq il-hama mingħajr l-aġġustament tal-pH.
21. L-effetti tossiċi tas-sustanzi kimiċi volatili, speċjalment fit-testijiet li fihom l-arja tgħaddi effervexxement mis-sistema, jistgħu jirriżultaw f'livelli ta' effett varjabbli minhabba t-telf tas-sustanza matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Għandha tiġi eżerċitata kawtela b'tali sustanzi billi ssir analiżi speċifika għas-sustanza tat-tahlitiet ta' kontroll li fihom is-sustanza u jiġi mmodifikat ir-reġim ta' arjażzjoni.

Sustanza kimika ta' referenza

22. Jekk 3,5-diklorofenol jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza, għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ta' 1,00 g ta' 3,5-diklorofenol f'1 000 ml ilma (15). Għandu jintuża ilma shun u/jew ultrasonifikazzjoni biex jiġi aċċellerat ix-xoljiment u biex is-soluzzjoni tilhaq il-volum meta titkessa għat-temperatura tal-kamra. Madankollu, għandu jiġi żgurat li s-sustanza kimika ta' referenza ma tinbidilx strutturalment. Il-pH tas-soluzzjoni għandu jiġi ċċekkjat u aġġustat, jekk ikun meħtieġ, b'NaOH jew H_2SO_4 sa pH 7 — 8.
23. Jekk jintuża sulfat tar-ram(II)pentaidrat bħala sustanza kimika ta' referenza, jintużaw konċentrazzjonijiet ta' 58 mg/l, 100 mg/l u 180 mg/l (fattur ta' 1,8). Is-sustanza tiġi ponderata direttament fir-reċipjenti tat-test (29 — 50 — 90 mg għal volum totali ta' 500 ml). Imbagħad tinhall b'234 ml ta' ilma tal-vit awtoklavat. Is-sulfat tar-ram(II)pentaidrat jinhall faċilment. Meta jinbeda t-test, jiżdiedu 16-il ml drenaġġ sintetiku u 250 ml hama miżjuda.

▼ **M6****Inibitur speċifiku tan-nitrifikazzjoni**

24. Għandha tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija ta' 2,32 g/l N-alliltjourea (ATU). Iż-żieda ta' 2,5 ml ta' din is-soluzzjoni ewlenija ma' tahlita ta' inkubazzjoni ta' volum finali ta' riżultati ta' 500 ml f'konċentrazzjoni finali ta' 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l) li hija magħrufa bħala suffiċjenti (4) biex tikkawża inibizzjoni ta' 100 % f'hama attivata nitrifikanti li fiha 1,5 g/l solidi sospiżi.

Kontroll abjotiku

25. F'ċerti kundizzjonijiet rari, sustanza kimika tat-test bi proprjetajiet riduċenti qawwija jistgħu jikkawżaw konsum ta' ossiġenu abjotiku li jista' jitkejjel. F'tali każijiet, huma mehtieġa kontrolli abjotiċi biex issir diskriminazzjoni bejn it-tehdid ta' ossiġenu abjotiku mis-sustanza kimika tat-test u r-respirazzjoni mikrobjali. Jistgħu jiġu ppreparati kontrolli abjotiċi billi l-inokulu jithalla barra mit-tahlitiet tat-test. B'mod simili, kontrolli abjotiċi mingħajr inokulu jistgħu jiġu inkluzi meta jitwettqu miżuri analitiċi biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni milhuqa matul il-fażi ta' espożizzjoni tal-ittestjar, eż. meta jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta' sustanzi kimiċi li ma tantx jinhallu fl-ilma b'komponenti b'solubbiltà fl-ilma differenti. F'każijiet speċifiċi, jaf ikun mehtieġ li jithejja kontroll abjotiku b'inokulu sterilizzat (eż. bl-awtoklavazzjoni jew iż-żieda ta' tossikanti sterilizzati). Xi sustanzi kimiċi jafu jipproduċu jew jikkunsmaw ossiġenu biss jekk l-erja tal-wiċċ hija kbira biżżejjed għal reazzjoni, anki jekk normalment iridu temperatura jew pressjoni ferm oghla biex jagħmlu hekk. F'dan ir-rigward, għandha tingħata attenzjoni speċjali lis-sustanzi perossidiċi. Inokulu sterilizzat jipprovdi erja tal-wiċċ kbira.

Inokulu

26. Għal użu ġenerali, għandha tingħabar hama attivata mill-hruġ tat-tank ta' arjazzjoni, jew qrib il-hruġ mit-tank, ta' impjant ta' trattament tal-ilma mormi operat sew li jirċievi fil-biċċa l-kbira drenaġġ domestiku. Skont il-fini tat-test, tipi jew sorsi oħra adegwata ta' hama attivata, eż. hama mkabbra fil-laboratorju, tista' tintuża f'konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi xierqa ta' 2 g/l sa 4 g/l. Madankollu, il-hama minn impjanti ta' trattament differenti x'aktarx li tessebixxi karatteristiċi u sensitivitajiet differenti.
27. Il-hama tista' tintuża kif miġbura iżda l-frak ohxon għandu jitneħħa billi jithalla joqghod għal perjodu qasir, eż. 5 sa 15-il minuta, u bid-dekantazzjoni tas-saff ta' fuq ta' solidi rqaq jew billi jingħadda minn passatur (eż. malja ta' 1 mm²). Inkella, il-hama tista' tiġi omoġenizzata f'mikser għal madwar 15-il sekonda jew iktar, iżda hija mehtieġa kawtela fir-rigward tal-forzi laterali u l-bidla fit-temperatura li tista' ssehh għal perjodi twal ta' tahlit.
28. Hafna drabi huwa mehtieġ il-ħasil tal-ħamrija, eż. jekk ir-rata ta' respirazzjoni endoġena tkun baxxa. Il-hama għandha l-ewwel tiġi ċentrifugata għal perjodu biex jiġi prodott supernatant u gerbub ta' solidi tad-drenaġġ, eż. 10 minuti f'madwar 10 000 m/s². Il-likwidu supernatanti għandu jintrema' u l-hama għandha tiġi sospiża mill-ġdid f'ilma tal-vit mingħajr kloru, billi titħawwad, u l-ilma tal-ħasil imbagħad għandu jitneħħa b'ċentrifugazzjoni mill-ġdid u billi jerġa' jitneħħa. Il-proċess tal-ħasil u ċ-ċentrifugazzjoni għandu jiġi ripetut, jekk ikun mehtieġ. Il-massa xotta ta' volum magħruf ta' hama sospiża mill-ġdid għandha tiġi ddeterminata u l-hama tiġi kkoncentrata billi jitneħħa l-likur jew tiġi dilwita iktar f'ilma tal-vit mingħajr

▼ M6

kloru biex jinkisbu l-koncentrazzjonijiet ta' solidi tal-ħama meħtieġa ta' 3 g/l. Il-ħama attivata għandha tiġi arjata kontinwament (eż. 2 l/minuta) fit-temperatura tal-ittestjar u, fejn ikun possibbli tintuża fil-jum tal-gbir. Jekk dan ma jkunx possibbli, il-ħama kuljum għandha tingħata drenaġġ sintetiku (50 ml ħama attivata mdahħla/l ta' drenaġġ sintetiku) għal jumejn oħra. Imbagħad il-ħama tintuża għat-test u r-riżultati jiġu aċċettati bħala validi, sakemm ma tkun sehħet ebda bidla sinifikanti fl-attività tagħha, ivvalutata mir-rata ta' respirazzjoni eterotropika u ta' nitrifikazzjoni endogena.

29. Jistgħu jinqalghu diffikultajiet jekk ikun hemm ragħwa matul l-inkubazzjoni sal-punt li r-ragħwa u s-solidi tal-ħama li jingarru magħha, jinħarġu mir-reċipjenti tal-arjazzjoni. Xi drabi, ir-ragħwa tista' sempliċement tirriżulta mill-preżenta tad-drenaġġ sintetiku, iżda wieħed għandu jantiċipa l-formazzjoni rar-ragħwa jekk is-sustanza kimika tat-test hija, jew fiha, aġent tensjoattiv. Telf ta' solidi tal-ħama mit-tahlitiet tal-ittestjar sejjer jirriżulta f'rati ta' respirazzjoni artifiċjalment inqas li bi żball jistgħu jiġu interpretati bħala riżultat tal-inibizzjoni. Barra minn hekk, l-arjazzjoni ta' soluzzjoni ta' aġent tensjoattiv tikkoncentra l-aġent tensjoattiv fis-saff tar-ragħwa; telf tar-ragħwa mis-sistema tal-ittestjar sejjer ibaxxi l-koncentrazzjonijiet tal-espożizzjoni. Ir-ragħwa tista' sempliċement tiġi kkontrollata b'metodi mekkanici sempliċi (eż. billi xi drabi tithawwad manwalment permezz ta' virga tal-ħġieg) jew biż-żieda ta' aġent kontra r-ragħwa b'emulsjoni tas-siliċju mingħajr aġenti tensjoattivi u/jew bl-użu tal-metodu ta' arjazzjoni tat-thawwid tal-flask. Jekk il-problema hija assoċjata mal-preżenza tad-drenaġġ sintetiku, il-kompożizzjoni tad-drenaġġ għandha tiġi mmodifikata billi jiġi inkluz reagent kontra r-ragħwa b'rata ta' eż. 50 µl/l. Jekk ir-ragħwa hija kkawzata mis-sustanza kimika tat-test, il-kwantità meħtieġa għat-tnaqqis għandha tiġi ddeterminata fil-koncentrazzjoni tat-test massima, u mbagħad ir-reċipjenti ta' arjazzjoni individwali kollha għandhom jiġu ttrattati bl-istess mod (inkluz dawk, eż. kontrolli inbjanki u r-reċipjenti ta' referenza fejn ma jkunx hemm ragħwa). Jekk jintużaw aġenti kontra r-ragħwa, ma għandu jkun hemm ebda interazzjoni mal-inokulu u/jew is-sustanza kimika tat-test.

PROCEDURA TAT-TEST

30. L-inibizzjoni ta' tliet drabi differenti ta' teħid ta' ossiġenu tista' tkun determinata, totali, eterotropika biss u dan minhabba n-nitrifikazzjoni. Normalment, il-kejl tal-inibizzjoni tat-teħid tal-ossiġenu totali għandu jkun adegwat. L-effetti fuq it-teħid tal-ossiġenu eterotropatiku mill-ossidazzjoni tal-karbonju organiku, u minhabba l-ossidazzjoni tal-ammonijaka huma meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit speċifiku għal tali żewġ punti ta' tmiem separati għal sustanza kimika partikolari jew (b'mod fakultattiv) biex jiġu spjegati kurvi ta' doza-rispons atipici mill-inibizzjoni tat-teħid totali tal-ossiġenu.

Kundizzjonijiet tat-test

31. It-test għandu jitwettaq f'temperatura fi ħdan il-medda ta' 20 ± 2 °C.

Tahlitiet tat-test

32. Għandhom jiġu ppreparati t-tahlitiet tal-ittestjar (F_T bħal fit-Tabella 1) li fihom l-ilma, għalf tad-drenaġġ sintetiku u s-sustanza kimika tat-test biex jinkisbu konċentrazzjonijiet nominali differenti tas-sustanza kimika tat-test (Ara t-Tabella 1 għal eżempji tal-volumi tal-kostitwenti). Il-pH għandu jiġi aġġustat għal 7.5 ± 0.5 , jekk ikun meħtieġ, it-tahlitiet għandhom jithalltu bl-ilma u l-inokulu miżjud biex jinkisbu volumi finali ugwali fir-reċipjenti u biex tinbeda l-arjazzjoni.

Tahlitiet ta' referenza

33. It-tahlitiet (F_R) għandhom jiġu ppreparati bis-sustanza kimika ta' referenza, eż. 3,5-diklorofenol, minflok is-sustanza kimika tat-test bl-istess mod bhat-tahlitiet tal-ittestjar.

▼ **M6****Kontrolli inbjank**

34. Fil-bidu (F_B) u fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni fit-testijiet li fihom il-bekkijiet jiġu kkonfigurati sekwenzjalment f'intervalli għandhom jiġu ppreparati kontrolli inbjanki (F_B). Fit-testijiet imwettqa permezz ta' tagħmir li jippermetti li jsiru kejljet simultanji tal-konsum tal-ossigenu, għandhom tal-inqas jiġu inkluzi żewġ kontrolli inbjanki f'kull lott ta' analiżi simultanja. Il-kontrolli inbjank li fihom volum ugwali ta' hama attivata u midjum sintetiku iżda mhux sustanza kimika tat-test jew ta' referenza. Dawn għandhom jithalltu mal-ilma sal-istess volum bħat-tahlitiet tat-test u ta' referenza.

Kontroll abjotiku

35. Jekk ikun mehtieg, pereżempju jekk sustanza kimika tat-test hija magħrufa jew suspettata li għandha proprjetajiet riduċenti qawwija, għandha tiġi ppreparata tahlita F_A biex jitkejjel il-konsum tal-ossigenu abjotiku. It-tahlita għandu jkollha l-istess ammonti ta' sustanza kimika tat-test, għalf tad-drenaġġ sintetiku u l-istess volum bħat-tahlitiet tat-test, iżda ebda hama attivata.

Proċedura u kejljet ġenerali

36. It-tahlitiet tat-test, it-tahlitiet ta' referenza u l-kontrolli inbjank u abijotiċi huma inkubati fit-temperatura tal-ittestjar f'kundizzjonijiet ta' arjazzjoni sfurzata (0,5 sa 1 l/min) biex il-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlul tinżamm 'il fuq minn 60 % — 70 % saturazzjoni u biex il-frak tal-hama jinżamm f'sospensjoni. Huwa mehtieg ukoll li l-kulturi jithawdu biex il-frak tal-hama jinżamm f'sospensjoni. L-inkubazzjoni hija kkunsidrata mibdija mal-kuntatt inizjali tal-inokulu tal-hama attivata ma' konsistenti oħra tat-tahlita finali. Fi tmiem l-inkubazzjoni, wara l-hinijiet ta' espożizzjoni speċifikati li s-soltu jkun ta' 3 sigħat, il-kampjuni jiġu rtirati biex titkejjel ir-rata ta' tnaqqis tal-konċentrazzjoni ta' ossigenu dissolt fiċ-ċellola ddisinjata għal dan il-ghan (Fig.2 tal-Appendiċi 3) jew fi flixkun BOD mimli kollu. Il-mod li bih jinbdew l-inkubazzjonijiet jiddependi fuq il-kapaċità tat-tagħmir użat biex ikejjel ir-rati ta' konsum tal-ossigenu. Pereżempju, jekk jinkludi sonda tal-ossigenu waħda, il-kejljet isiru b'mod individwali. F'dan il-każ, id-diversi tahlitiet mehtieġa għat-test fid-drenaġġ sintetiku għandhom jiġu ppreparati iżda l-inokulu għandu jinżamm, u l-porzjonijiet mehtieġa ta' hama għandhom jizdiedu ma' kull reċipjent tas-serje. Kull inkubazzjoni għandha tinbeda sussegwentement, f'intervalli konvenjentement puntwali ta' eż. 10 sa 15-il minuta. Inkella, is-sistema ta' kejl tista' tinkludi diversi sondi li jiffaċilitaw kejljet multipli simultanji; f'dan il-każ, l-inokulu jista' jizdied fl-istess hin ma' gruppi ta' reċipjenti xierqa.
37. Il-konċentrazzjoni tal-hama attivata fit-tahlitiet tal-ittestjar, ta' referenza u inbjank kollha (iżda mhux ta' kontroll abijotiku) hija nominalment 1,5 g/l ta' solidi suspizi. Il-konsum ta' ossigenu għandu jitkejjel wara 3 sigħat ta' espożizzjoni. Għandhom isiru kejljet addizzjonali tal-espożizzjoni ta' 30 minuta kif xieraq u kif deskritt precedentement fil-paragrafu 5.

Potenzjal ta' nitrifikazzjoni tal-hama

38. Sabiex jiġi deċiż jekk il-hama tinitrifikax u, jekk iva, b'liema rata, għandhom jiġu ppreparati tahlitiet (F_B) bħal fit-tahlitiet ta' kontroll inbjank u ta' "kontroll" addizzjonali (F_N) li iżda fihom ukoll N-alliltjorea f'11,6 mg/l.

▼ **M6**

It-tahlitiet għandhom jiġu arjati u inkubati f $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ għal 3 sigħat. Imbagħad għandhom jitkejlu r-rata ta' teħid tal-ossigenu u għandha tiġi kkalkolata r-rata ta' teħid tal-ossigenu minhabba n-nitrifikazzjoni.

Disinji tat-test

Test tas-sejba tal-medda

39. Meta jkun meħtieġ jintuża test preliminari, biex tiġi stmata l-medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test meħtieġa f'test finali għad-determinazzjoni tal-inibizzjoni tal-konsum tal-ossigenu. Inkella, in-nuqqas ta' inibizzjoni tal-konsum tal-ossigenu mis-sustanza kimika tat-test f'test preliminari jista' juri li test finali mhuwiex meħtieġ, iżda għandhom jiġu inkluzi triplikati fl-ogħla konċentrazzjoni ttestjata tat-test preliminari (ġeneralment 1 000 mg/l, iżda li jiddependu fuq ir-rekwiżit tad-dejta).

Tabella 1

Eżempji ta' tahlitiet għat-test preliminari

Reaġent	Konċentrazzjoni Originali				
Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test	10 g/l				
Soluzzjoni ewlenija tal-midjum sintetiku	Ara l-paragrafu 16				
Sospensjoni ewlenija tal-ħama attivata	3 g/l solidi sospiżi				
Komponenti tat-tahlita	Dożaġġ f'reċipjenti tat-test ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (ml) (paragrafi 19 sa 21)	0,5	5	50	0	50
Soluzzjoni ewlenija tal-ghalf ta' drenaġġ sintetiku (ml) (paragrafu 16)	16	16	16	16	16
Sospensjoni ta' ħama attivata (ml) (paragrafi 26 sa 29)	250	250	250	250	250
Ilma (paragrafu 15)	233,5	229	184	234	434
Volum totali tat-tahlitiet (ml)	500	500	500	500	500
Konċentrazzjonijiet fit-tahlita					
Sospensjoni tal-ittestjar (mg/l) Ħama attivata	10	100	1 000	0	1 000
(solidi sospiżi) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(a) L-istess proċedura għandha tiġi segwita għas-sustanza kimika ta' referenza, biex jiġu kkalkolati flasks F_{R1-3}

40. It-test għandu jitwettaq tal-inqas permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, pereżempju, 10 mg/l, 100 mg/l u 1 000 mg/l b'kontroll inbjank u, jekk ikun hemm b'żonn, tal-inqas tliet kontrolli abjotiċi bl-ogħla konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test (ara bħala eżempju

▼ M6

t-Tabella 1). Idealment l-inqas konċentrazzjoni ma għandu jkollha l-ebda effett fuq il-konsum tal-ossigenu. Għandhom jiġu kkalkolati r-rati ta' teħid ta' ossigenu u r-rata ta' nitrifikazzjoni, jekk ikunu rilevanti; imbagħad għandu jiġi kkalkolat il-perċentwal ta' inibizzjoni. Skont l-iskop tat-test, huwa possibbli wkoll li sempliċement tiġi ddeterminata t-tossicità ta' konċentrazzjoni limitu, pereżemju 1 000 mg/l. Jekk ma jsehh ebda effett tossiku statistikament sinifikanti f'din il-konċentrazzjoni, mhuwiex meħtieġ ittestjar ulterjuri f'konċentrazzjonijiet oġġla jew inqas. Għandu jiġi nnotat li sustanzi li ma tants jinhallu fl-ilma, tahlitiet b'komponenti ta' solubbiltà fl-ilma differenti u s-sustanzi adsorbivi għandhom jiġu ponderati direttament fir-riċipjenti tat-test. F'dan il-każ, il-volum riservat għas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza tat-test għandu jiġi sostitwit b'ilma tat-tahlit.

Test finali

Inibizzjoni tat-teħid totali tal-ossigenu

41. It-test għandu jitwettaq permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni mnaqqsa mit-test preliminari. Sabiex jinkisbu kemm l-NOEC kif ukoll l-EC_x (eż. l-EC₅₀), fil-biċċa l-kbira tad-drabi huma rakkomandati sitt kontrolli u hames konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika b'hames repliki. Il-kontroll abjotiku ma għandux bżonn jiġi ripetut jekk ma kien hemm ebda teħid tal-ossigenu fit-test preliminari, iżda jekk isehh teħid sinifikanti, għandhom jiġu inkluzi kontrolli abijotiċi għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Is-sensittività tal-hama għandha tiġi vverifikata permezz tas-sustanza kimika ta' referenza 3,5-diklorofenol. Is-sensittività tal-hama għandha tiġi vverifikata għal kull serje ta' testijiet, peress li s-sensittività hija magħrufa li tvarja. Fil-każijiet kollha, il-kampjuni huma rtirati mir-riċipjenti tat-test wara 3 sigħat, u 30 minuta addizzjonali jekk ikun meħtieġ, għall-kejl tar-rata ta' teħid tal-ossigenu fiċ-ċellola tal-elettrodi tal-ossigenu. Mid-dejta miġbura, jiġu kkalkolati r-rati ta' respirazzjoni speċifiċi tat-tahlitiet ta' kontroll u tal-ittestjar; imbagħad il-perċentwal tal-inibizzjoni jiġi kkalkolat mill-ekwazzjoni 7, hawn taht.

Distinzjoni bejn inibizzjoni ta' respirazzjoni eterotropika u nitrifikazzjoni

42. L-użu ta' inibitur ta' nitrifikazzjoni speċifiku, ATU, jippermetti l-valutazzjoni diretta tal-effetti inibitorji tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq l-ossidazzjoni eterotropika, u billi titnaqqas ir-rata ta' teħid tal-ossigenu fil-preżenza tal-ATU mir-rata ta' teħid totali (l-ebda ATU preżenti), jistgħu jiġu kkalkolati l-effetti fuq ir-rata ta' nitrifikazzjoni. Għandhom jiġu ppreparati żewġ settijiet ta' tahlitiet ta' reazzjoni skont id-disinji tal-ittestjar għall-EC_x jew l-NOEC deskritti fil-paragrafu 41, iżda barra minn hekk, l-ATU għandu jizdied ma' kull tahlita ta' sett wieħed fil-konċentrazzjoni finali ta' 11,6 mg/l, li ntweriet li tinibixxi kompletament in-nitrifikazzjoni fil-hama b'konċentrazzjonijiet ta' solidi sospiżi sa 3 000 mg/l (4). Ir-rati ta' teħid ta' ossigenu għandhom jitkejlu wara l-perjodu ta' espożizzjoni; dawn il-valuri diretti jirrapprezentaw ir-respirazzjoni eterotropika biss, u d-differenzi bejn dawn ir-rati ta' respirazzjoni u dawk totali korrispondenti jirrapprezentaw in-nitrifikazzjoni. Imbagħad jiġu kkalkolati d-diversi gradi ta' inibizzjoni.

Kejl

43. Wara l-perjodu/perjodi ta' espożizzjoni, għandu jiġi ttrasferit kampjun mill-ewwel riċipjent ta' arjażzjoni lejn iċ-ċellola tal-elettrodi tal-ossigenu (Fig. 1 tal-Appendiċi 2) u l-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlula għandha titkejjel minnufih. Jekk tkun disponibbli sistema tal-elettrodi multipla, allura l-kejl jistgħu jsiru b'mod simultanju. It-taħwid (permezz ta' kalamita mġottija) huwa essenzjali fl-istess rata bħal meta l-elettrodu jiġi kkalibrat biex jiżgura li s-sonda tirrispondi b'dewmien minimu għall-konċentrazzjonijiet tal-ossigenu li jinbidlu, u biex ikun jista' jitkejjel l-ossigenu regolari u riprodubbli

▼ **M6**

fir-reċipjent tal-kejl. Generalment, is-sistema tas-sonda li tithawwad awtomatikament ta' xi elettrodi tal-ossigenu hija adegwata. Iċ-ċellola għandha titlahlah bl-ilma bejn kull kejl. Inkella, il-kampjun jista' jintuża biex jimla flixxkun BOD (Fig. 2 tal-Appendiċi 3) mghammar b'hawwad manjetiku. Imbagħad għandha tiddaħhal sonda tal-ossigenu bi sleeve adaptor fl-ghonq tal-flixxkun u l-hawwad manjetiku għandu jiġi attivat. Fiz-żewġ każijiet, il-konċentrazzjoni ta' ossigenu dissolt għandha titkejjel b'mod kontinwu u rreġistrata għal perjodu, generalment 5 sa 10 minuti jew sakemm il-konċentrazzjoni taqa' taht iż-2 mg/l. L-elettrodu għandu jitneħħa, it-tahlita terġa' titpoġġa fir-reċipjent tal-arjazzjoni u għandhom jitkomplew l-arjazzjoni u t-tahwid, jekk ikun meħtieġ kejl wara perjodi ta' espożizzjoni twal.

Verifika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

44. Għal xi finijiet, jaf ikun meħtieġ li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Wiehed għandu jinnotta li jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta':

- sustanzi li ma tantx jinhallu fl-ilma,
- tahlitiet b'komponenti b'solubbiltà fl-ilma differenti, jew
- sustanzi b'solubbiltà fl-ilma tajba, iżda fejn il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija tqarreb is-solubbiltà fl-ilma massima,

jintuża, il-parti mahlula hija magħrufa, u l-konċentrazzjoni reali tas-sustanza kimika tat-test li hija ttrasferita fir-reċipjenti tat-test mhijiex magħrufa. Sabiex tiġi kkaratterizzata l-espożizzjoni, hija meħtieġa stima analitika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test. Biex jiġu simplifikati l-kwistjonijiet, għandha ssir stima analitika qabel iż-żieda tal-inokulu. Minhabba l-fatt li l-frazzjonijiet mahlula biss sejrni jiġu ttrasferiti fir-reċipjenti tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla jistghu jkunu baxxi hafna.

45. Sabiex tiġi evitata analitika li tiegħu l-hin u li tiswa hafna flus, huwa rakkomandat li s-sustanza kimika tat-test tiġi sempliċement ppeżata fir-reċipjenti tat-test u li ssir referenza għall-konċentrazzjoni nominali ponderata inizjali għal kalkoli sussegwenti. Mhijiex meħtieġa distinzjoni bejn frazzjonijiet mahlula, mhux mahlula jew adsorbiti tas-sustanza kimika tat-test peress li dawn il-frazzjonijiet kollha jidhru f'kundizzjonijiet reali f'impjant ta' trattament tal-ilma mormi bl-istess mod, u dawn il-frazzjonijiet jista' jvarjaw skont il-kompożizzjoni tad-drenaġġ. L-ghan tal-metodu ta' ttestjar huwa li jagħti stima realistika tal-konċentrazzjoni inibitorja u mhuwiex xieraq biex jinvestiga fid-dettall liema frazzjonijiet jagħmlu kontribuzzjoni għall-inibizzjoni tal-organizmi tal-hama attivata. Fl-ahhar nett, is-sustanzi adsorbivi għandhom jintiżnu direttament ukoll fir-reċipjenti tat-test; u r-reċipjenti għandhom jiġu silanizzati biex jitnaqqas it-telf permezz ta' adsorbiment.

DEJTA U RAPPORTAR**Kalkolu tar-rati ta' tehid tal-ossigenu**

46. Ir-rati ta' tehid tal-ossigenu għandhom jiġu kkalkolati mill-medja tal-valuri mkejla, perzempju minn parti lineari tal-graffs tal-konċentrazzjoni tal-ossigenu meta mqabbel mal-hin, billi jiġu limitati l-kalkoli tal-konċentrazzjonijiet tal-ossigenu bejn 2,0 mg/l u 7,0 mg/l, peress li konċentrazzjonijiet oghla u inqas jistghu huma stess jinfluwenzaw ir-rati ta' konsum. Devjazzjoni minn dawn il-faxex ta' konċentrazzjoni taht jew 'il fuq minn dawn il-valuri

▼ **M6**

hija xi drabi inevitabbli u mehtieġa, pereżempju, meta r-respirazzjoni tkun imrażżna hafna u konsegwentement bil-mod hafna, jew jekk xi hama attivata partikolari jkolha respirazzjoni mgħaġġla hafna. Dan huwa aċċettabbli sakemm is-sezzjonijiet estiżi tal-graff tat-tehid huma dritti u l-gradjenti tagħhom ma jinbidlux peress li jghaddu mil-limiti ta' 2,0 mg/l jew 7,0 mg/l O₂. Kwalunkwe sezzjoni mgħawġa tal-graff tindika li s-sistema ta' kejl qiegħda tistabbilizza jew ir-rata ta' tehid qiegħda tinbidel u ma għandhiex tintuża għall-kalkolu tar-rati ta' respirazzjoni. Ir-rata ta' tehid tal-ossiġenu għandha tiġi espressa f'milligrammi għal kull litru fis-sieġha (mg/lh) jew milligrammi għall kull gramma hama xotta fis-sieġha (mg/gh). Ir-rata ta' konsum tal-ossiġenu, R, f'mg/lh, tista' tiġi kkalkolata jew interpolata mill-parti lineari tal-graff ta' tnaqqis tal-ossiġenu rreġistrata skont l-Ekwazzjoni 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \quad (1)$$

fejn:

Q₁ hija l-koncentrazzjoni tal-ossiġenu fil-bidu tas-sezzjoni magħżula tal-fażi lineari (mg/l);

Q₂ hija l-koncentrazzjoni tal-ossiġenu fi tmiem is-sezzjoni magħżula tal-fażi lineari (mg/l);

Δ_t huwa l-intervall ta' hin bejn dawn iż-żewġ kejljet (min.).

47. Ir-rata ta' respirazzjoni speċifika (R_s) hija espressa bhala l-ammont ta' ossiġenu kkunsmat għal kull gramma ta' piż xott ta' hama fis-sieġha (mg/gh) skont l-Ekwazzjoni 2:

$$R_s = R/SS \quad (2)$$

fejn SS hija l-koncentrazzjoni tas-solidi suspizi fit-tahlita tal-ittestjar (g/l).

48. L-indiċijiet differenti ta' R li jistgħu jingħaqdu flimkien huma:

S rata speċifika

T rata ta' respirazzjoni totali

N rata minhabba respirazzjoni tan-nitrifikazzjoni

H rata minhabba respirazzjoni eterotropika

A rata minhabba l-proċessi abijotiċi

B rata bbażata fuq l-assaġġi inbjank (medja)

Kalkolu tar-rata ta' tehid tal-ossiġenu minhabba n-nitrifikazzjoni

49. Ir-relazzjoni bejn ir-respirazzjoni totali (R_T), ir-respirazzjoni tan-nitrifikazzjoni (R_N) u r-respirazzjoni eterotropika (R_H) tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 3:

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

fejn:

R_N hija r-rata ta' tehid tal-ossiġenu minhabba n-nitrifikazzjoni (mg/lh);

R_T hija r-rata mkejla tar-rata tal-ossiġenu mill-kontroll inbjank (l-ebda ATU; F_B) (mg/lh).

R_H hija r-rata mkejla tar-rata tal-ossiġenu tal-kontroll inbjank b'ATU miżjud (F_N) (mg/lh).

▼ **M6**

50. Din ir-relazzjoni hija valida għal valuri vojta (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), kontrolli abjotiċi (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) u assaġġi b'kimiċi ta' prova (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). Rati ta' respirazzjoni speċifiċi huma kkalkolati minn:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Jekk R_N hija insinifikanti (eż. $< 5\%$ ta' R_T f'kontrolli inbjanki) f'test preliminari, wieħed jista' jassumi li t-tehid tal-ossigenu eterotrofik huwa ugwali għat-tehid totali u li mhi qieghda ssehh ebda nitrifikazzjoni. Ikun mehtieg sors alternattiv ta' hama attivata, jekk it-testijiet kellhom jikkunsidraw l-effetti fuq il-mikro-organizmi eterotrofiċi u nitrifikanti. Test finali jitwettag jekk ikun hemm evidenza ta' rati ta' tehid tal-ossigenu suppressi b'koncentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test differenti.

Kalkolu tal-perċentwal tal-inibizzjoni

52. Il-perċentwal tal-inibizzjoni, I_T , tal-konsum tal-ossigenu totali f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, jiġi kkalkolat bl-Ekwazzjoni 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\% \quad (7)$$

53. Bl-istess mod, il-perċentwal ta' inibizzjoni tat-tehid tal-ossigenu eterotrofik, I_H , f'kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, jiġi kkalkolat bl-Ekwazzjoni 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\% \quad (8)$$

54. Fl-aħhar nett, l-inibizzjoni tat-tehid tal-ossigenu minhabba n-nitrifikazzjoni, I_N , f'kull konċentrazzjoni, tiġi kkalkolata bl-Ekwazzjoni 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\% \quad (9)$$

55. Il-perċentwal tal-inibizzjoni tat-tehid tal-ossigenu għandu jiġi pplottjat mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (kurva ta' inibizzjoni, ara Fig.3 tal-Appendiċi 4). Il-kurvi ta' inibizzjoni jiġu pplottjati għal kull perjodu ta' arjażzjoni ta' 3 sigħat jew addizzjonalment wara 30 minuta. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tinibixxi t-tehid tal-ossigenu sa 50% (EC_{50}) għandha tiġi kkalkolata jew interpolata mill-graff. Jekk tkun disponibbli dejta xierqa, il-limiti ta' kunfidenza ta' 95% ta' EC_{50} , il-gradjent tal-kurva, jistgħu jiġu kkalkolati jew interpolati l-valuri xierqa biex jiġi mmarrat il-bidu tal-inibizzjoni (pereżempju, EC_{10} jew EC_{20}) u t-tmiem tal-medda ta' inibizzjoni (eż., EC_{80} jew EC_{90}).

56. Għandu jiġi nnotat li fid-dawl tal-varjabbiltà li hafna drabi tiġi osservata fir-riżultati, f'hafna każijiet jaf ikun suffiċjenti li r-riżultati jiġu espressi skont id-daqs, pereżempju:

$$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \quad 1 \text{ mg/l sa } 10 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} \quad 10 \text{ mg/l sa } 100 \text{ mg/l}$$

$$EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$$

Interpretazzjoni tar-riżultati

EC_x

▼ **M6**

57. Il-valuri EC_x inkluz il-limiti ta' kunfidenza baxxi u superjuri assoċjati tagħhom ta' 95 % għall-parametru huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni loġistika jew Weibull, metodu Spearman-Kärber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi (11)). EC_x tinkiseb billi jiddaħhal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l- EC_{50} jew kwalunkwe EC_x , il-medji għal kull trattament (x) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

Stima NOEC

58. Jekk analiżi statistika hija mahsuba biex tiddetermina l-NOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument tal-OECD dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta Ekotossika: Gwida għall-Applikazzjoni (11). B'mod ġenerali, l-effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (izgħar) bi tmiem wieħed $f_p \leq 0,05$.

Rapport tal-ittestjar

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

Sustanza kimika tat-test

- isem komuni, isem is-sustanza kimika, numru CAS, purità;
- il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log K_{ow} , is-solubbiltà fl-ilma, il-pessjoni tal-fwar, il-kostant ta' Henry (H) u informazzjoni possibbli dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test, eż. adsorbiment mal-hama attivata);

Sistema tat-test

- sors, kundizzjonijiet ta' operazzjoni tal-impjant ta' trattament tal-ilma mormi u l-influent li jirċievi, il-konċentrazzjoni, it-trattament minn qabel u ż-żamma tal-hama attivata;

Kundizzjonijiet tat-test

- it-temperatura tal-ittestjar, il-pH matul l-ittestjar u d-durata tal-fażi(jiet) ta' espożizzjoni;

Riżultati

- konsum speċifiku tal-ossiġenu tal-kontrolli ($mg\ O_2/(g \times h$ ta' hama);
- id-dejta mkejla, il-kurva(i) ta' inibizzjoni u l-metodu għall-kalkolu ta' EC_{50} ;
- EC_{50} u, jekk ikun possibbli, 95 fil-mija tal-limiti ta' kunfidenza, possibbilment EC_{20} , EC_{80} ; possibbilment NOEC u l-metodi statistiċi użati, jekk EC_{50} ma jistax jiġi ddeterminat;
- ir-riżultati għall-inibizzjoni totali, u jekk tkun meħtieġa eterotrofika u nitrifikanti;
- tehid ta'ossiġenu abijotiku fil-kontroll fiżikokimiku (jekk jintuża);
- l-isem tas-sustanza kimika ta' referenza u r-riżultati b'din is-sustanza kimika;
- l-osservazzjonijiet u d-devjazzjonijiet kollha mill-proċedura standard, li setgħu jinfluwenzaw ir-riżultat.

LETTERATURA

- (1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼ M6

- (2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
- (3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.
- (5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.
- (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
- (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.
- (8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.
- (9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
- (10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.
- (11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼ M6*Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organizmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC₅₀ hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

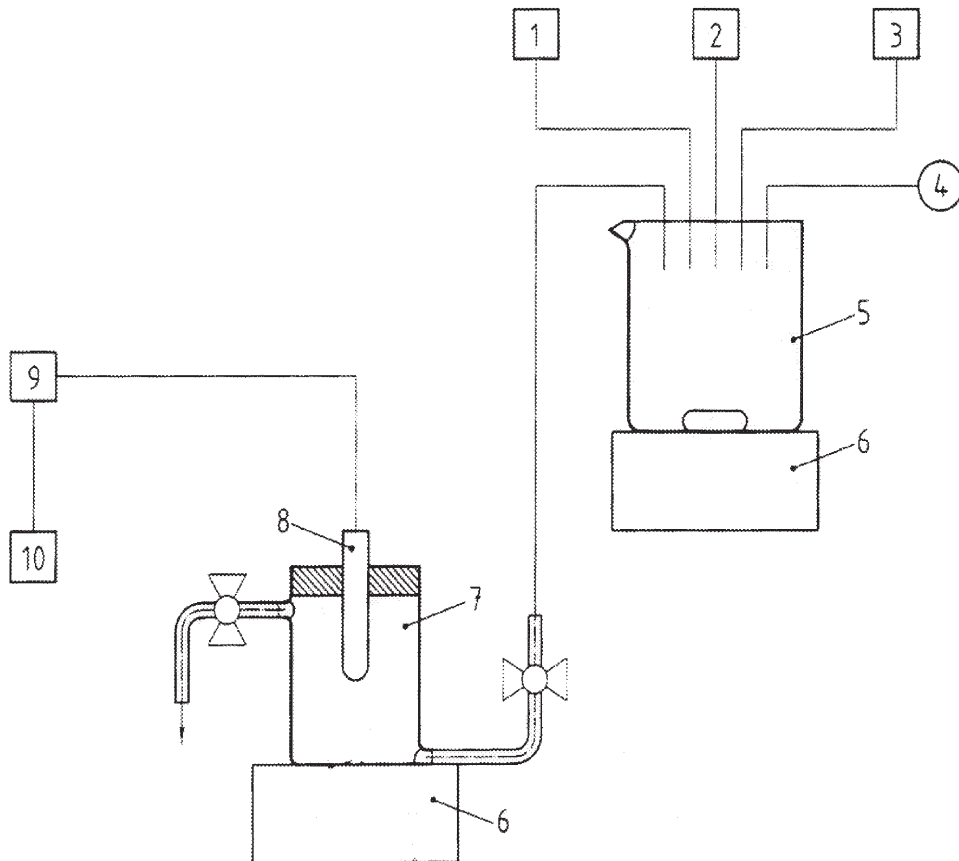
NOEC (konċentrazzjoni bla effett osservat) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ **M6**

Appendiċi 2

Fig. 1: Eżempji għall-kejl tal-unità

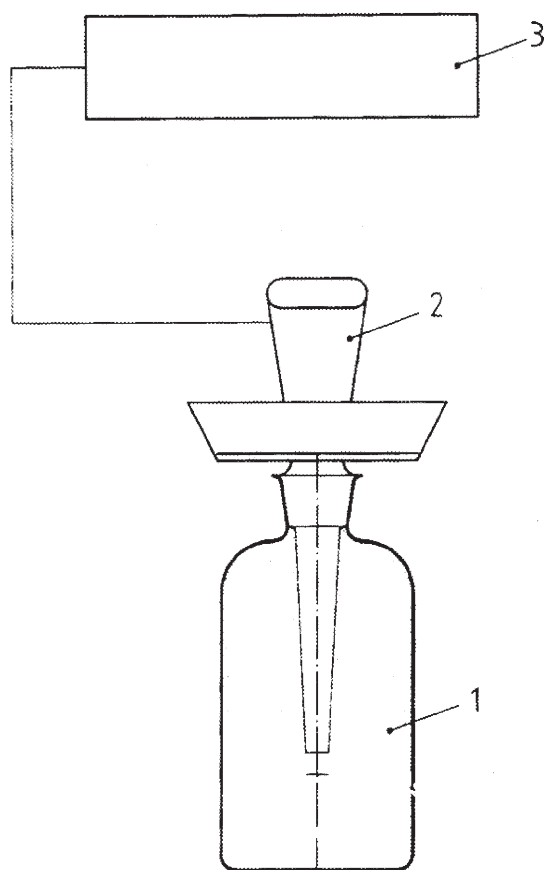
*Spjega*

1 hama attivata	6 hawwad manjetiku
2 midjum sintetiku	7 ċellola li tkejjel l-ossigenu
3 sustanza kimika tat-test	8 elettrodu tal-ossigenu
4 arja	9 strument li jkejjel l-ossigenu
5 reċipjent tat-tahlit	10 registratur

▼ **M6**

Appendiċi 3

Fig. 2: Eżempju tal-unità tal-kejl, permezz ta' flixkun BOD

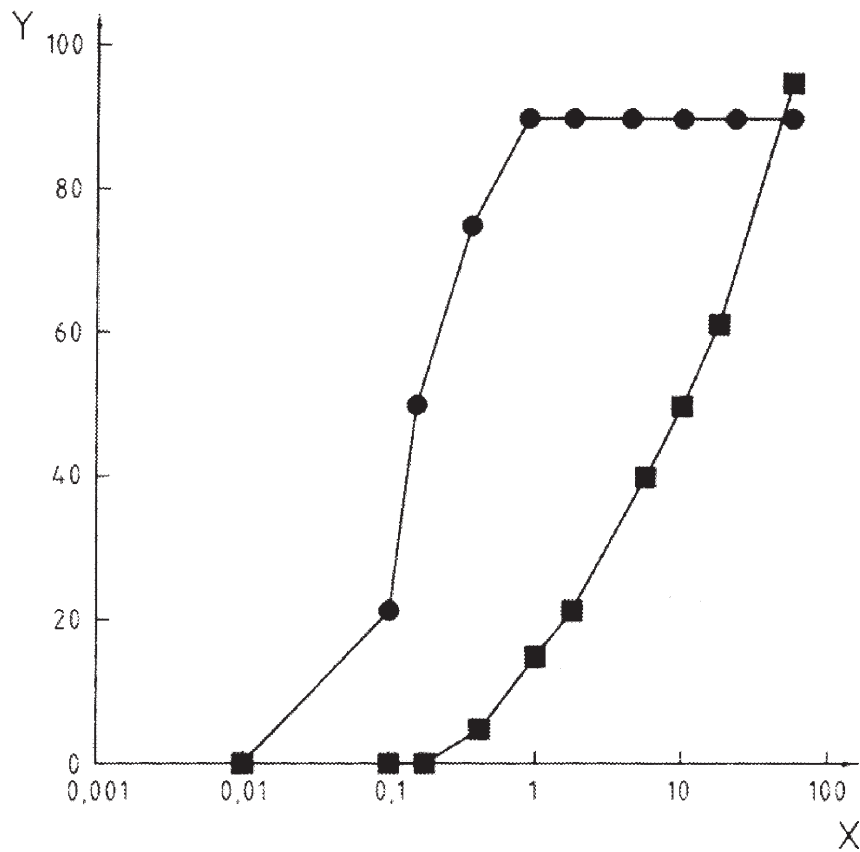
*Spjega*

- 1 Reċipjent tal-ittestjar
- 2 elettrodu tal-ossiġenu
- 3 strument li jkejje l-ossiġenu

▼ **M6**

Appendiċi 4

Fig. 3: Eżempji ta' kurvi tal-inibizzjoni



Spjega

X konċentrazzjoni ta' 3,5-dichlorophenol (mg/l)

Y Inibizzjoni (%)

■ respirazzjoni eterotrofica tal-inibizzjoni permezz ta' ħama nitrifikanti

● nitrifikazzjoni tal-inibizzjoni permezz ta' ħama nitrifikanti.



C.12. BIJODEGRADAZZJONI

TEST SCAS MODIFIKAT

1. METODU

1.1. INTRODUZZJONI

L-għan tal-metodu huwa l-valutazzjoni tal-bijodegradabilità aħharija potenzali tas-sostanzi organiċi li jinhallu fl-ilma u li ma jinxfix malajr meta esposti għall-konċentrazzjonijiet relattivament għoljin ta' mikrorganizmi fuq perjodu ta' żmien twil. Il-vijabbiltà tal-mikrorganizmi hija mantenuta fuq dan il-perjodu biż-żieda ta' kuljum ta' dhul ta' drenagg. (Għar-rekwiżiti fi tniem il-ġimgha, id-drenagg jista' jinżamm f'temperatura ta' 4° C. Alternattivament, id-drenagg sintetiku tat-test konfermatorju OECD jista' jintuża.)

L-assorbiment fiziko-kemikali tal-bicċiet sospizi jista' jsehh, u dan għandu jitqies meta jiġu interpretati r-riżultati (ara 3.2.).

Minhabba l-perjodu twil ta' detenzjoni tal-fażi likwida (36 siegħa), u ż-żieda intermittenti tan-nutrijenti, t-test ma jstimulax il-kondizzjonijiet esperjenzati fl-impjant tat-trattament tad-drenagg. Ir-riżultati miksuba mill-varji sostanzi tat-test jindikaw li t-test għandu potenzal għoli ta' biodegradazzjoni.

Il-kondizzjonijiet provduti mit-test huma favorevoli hafna għall-għażla u/jew l-adattazzjoni ta' mikrorganizmi kapaċi jiddegradaw il-kompost tat-test. (Il-proċedura tista' tkun użata wkoll sabiex tipproduċi inocula akklijatizzati għall-użu tagħhom f'testijiet oħrajn.)

F'dan il-metodu, l-kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbon organiku mahlul huwa użat sabiex jistima l-bijodegradabilità aħharija tas-sostanzi tat-test. Huwa preferibbli li jiġi ddeterminat id-DOC wara l-aċidifikazzjoni u l-tindif milli bħala d-differenza Ctotali – Cinorganika

L-użu simultaneju ta' metodu speċifiku analitiku jista' jippermetti l-istima tad-degradazzjoni primarja tas-sostanza (ma jibqax tidher l-istruttura tal-kimika originali).

Il-metodu huwa applikabbli biss għal dawk is-sostanzi organiċi tat-test li, bil-konċentrazzjoni użata fit-test:

— jinhallu fl-ilma (ta' l-anqas 20mg organiku mahlul karbon/litru),

— għandhom pressjoni ta' l-istijm negligibbli,

— m'humiex inibitorji għall-batteri,

— m'humiex assobiti b'mod sinifikattiv fis-sistema tat-test,

— m'humiex mitlufa b'fowming mit-tahlita tat-test.

Il-kontenut tal-karbon organiku tal-materjal tat-test għandu jiġi stabil.

▼B

Informazzjoni fuq il-porzjonijiet relattivi tal-komponenti l-maġġuri tal-materjal tat-test tkun b'żonnjuża sabiex jiġu interpretati r-riżultati miksuba, partikolarment f'dawk il-każijiet fejn ir-riżultati huma baxxi jew marginali.

Informazzjoni fuq it-tossicità għall-mikrorganizmi tas-sostanza tista' tkun b'żonnjuża sabiex tinterpreta r-riżultati baxxi u fl-ghażla ta' konċentrazzjoni xierqa tat-test.

1.2. DEFINIZZJONJET U UNITAJIET

C_T = konċentrazzjoni tal-kompost tat-test bħala karbon organiku kif jinstab jew miżjud mad-drenaġ li jkun qagħad fil-bidu tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru),

C_t = konċentrazzjoni ta' karbon organiku mahlul li jinstab fit-tahlita supernatanta tat-test fit-tmien tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru),

C_c = konċentrazzjoni ta' karbon organiku mahlul li jinstab fit-tahlita supernatanta tal-kontroll fit-tmien tal-perjodu ta' aerjazzjoni (mg/litru).

Il-biodegradazzjoni hija definita b'dan il-metodu bħala l-iskopariment tal-karbon organiku. Il-biodegradazzjoni tista' tiġi espressa bħala:

1. Il-perċentwal tat-tneħħija ta' D_{da} ta' l-ammont tas-sostanza miżjuda kuljum:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \quad [1]$$

fejn

D_{da} = degradazzjoni/żieda ta' kuljum.

2. Il-perċentwali tat-tneħħija D_{ssd} ta' l-ammont tas-sostanza fil-bidu ta' kull jum:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 (b)]$$

fejn

D_{ssd} = degradazzjoni/bidu ta' sostanza tal-ġurnata;

l-indiċi i u $(i + 1)$ jirreferu għall-ġurnata li fiha sar il-kejl.

Il-formula 2(a) hija rrakkomandata jekk l-effluent DOC ivarja minn jum għal jum, filwaqt li l-formula 2(b) tista' tkun użata meta l-effluent DOC jibqa' relattivament kostanti minn ġurnata għall-oħra.

▼B

1.3. SOSTANZI TA' REFERENZA

Fċerti każijiet, meta xi sostanza ġdida tkun qed tiġi investigata, s-sostanzi ta' referenza jistgħu jkunu ta' benefiċċju, però, m'hi rakkomandata l-ebda sostanza ta' referenza hawnhekk.

Id-*data* fuq bosta komposti evalwati fit-testijiet ring huma provduti (ara l-Appendiċi 1) primarjament sabiex il-kalibrazzjoni tal-metodu tkun tista' ssir minn żmien għall-iehor u sabiex tippermetti tqabbil tar-riżultati meta jkun applikat metodu iehor.

1.4. METODU PRINĊIPALI TAT-TEST

Tajn attivat minn impjant tat-trattament tad-drenaġġ huwa mpoġġi f'unità ta' tajn attivat semikontinwu (SCAS). Il-kompost tat-test u d-drenaġġ li jkun qagħad huma miżjuda, u t-tahlita hija aerjata għall-23 siegħa. L-aerjazzjoni hija imbagħad imwaqqfa, it-tajn joqghod u t-tahlita supernatanta hija mnehhija.

It-tajn li jkun baqa' fil-kontenitur ta' aerjazzjoni huwa imbagħad imhallat ma' alikwot iehor tal-kompost tat-test u d-drenaġġ, u ċiklu huwa imbagħad ripetut.

Il-bijodegradazzjoni hija stabbilita bid-determinazzjoni tal-kontenut tal-karbon organiku mahlul fit-tahlita supernatanta. Il-valur huwa imbagħad imqabbel ma' dak misjub għat-tahlita miksuba mit-tubu ta' kontroll bid-doża tad-drenaġġ li qagħad.

Meta huwa użat metodu speċifiku analitiku, t-tibdil fil-konċentrazzjoni tal-molekula oriġinali minhabba l-biodegradazzjoni tista' tiġi mkejla (bijodegradabilità primarja).

1.5. KRITERJI TAL-KWALITÀ

Ir-reproduċibilità ta' dan il-metodu bbażata fuq it-tnehhija tal-karbon organiku mahlul għada ma gietx stabilizzata. (Meta tiġi kkonsiderata l-bijodegradazzjoni primarja, hija miksuba *data* preċiża ħafna għall-materjali li huma degradati estensivament.)

Is-sensittività tal-metodu hija ddeterminata ħafna mill-varjabbilità tal-blank u, xi ftit inqas, mill-preċiżjoni tad-determinazzjoni tal-karbon organiku mahlul u l-livell tal-kompost tat-test fit-tahlita fil-bidu ta' kull ċiklu.

1.6. DESKRIZZJONI TAL-PROCĊEDRA TAT-TEST

1.6.1. *Preparazzjonijiet*

Nurmu suffiċjenti ta' unitajiet ta' aerjazzjoni nodfa, tista' tiġi użata. L-unità SCAS ta' 1,5 litru oriġinali u tubi li jdahhlu l-arja (Figura 1) għall-kull sostanza tat-test u l-kontrolli huma mibnjin. Arja kkompressata fornita lill-unitajiet tat-test, mnaddfa b'tajjara, għandhom ikunu nodfa mill-karbon organiku u presaturati bl-ilma sabiex jiġu mnaqqas t-telf minhabba l-evaporazzjoni.

Kampjun ta' tahlita, li fiha 1 sa 4 gr solidi/litru sospensjoni, hija miksuba mill-impjant tat-tajn attivat li jitratta predominant d-drenaġġ domestiku. Madwar 150 ml tat-tahlita huma mehtieġa għall-kull unità ta' aerjazzjoni.

▼B

Tahlit ta' l-istokk tas-sostanza tat-test hija ppreparata fl-ilma distillate; il-konċentrazzjoni normalment mehtieġa hija ta' 400 mg/litru bħala karbon organiku li tagħti konċentrazzjoni tal-kompost tat-test ta' 20 mg/litru fil-bidu ta' kull ċiklu ta' aerjazzjoni jekk ma ssehh l-ebda bijodegradazzjoni.

Konċentrazzjonijiet oghla huma permessi jekk it-tossicità tal-mikro-organizmi tippermettiha.

Il-kontenut tal-karbon organiku tat-tahlita ta' l-istokk hija mkejla.

1.6.2. *Kondizzjonijiet tat-test*

It-test għandu jsir f'temperatura ta' bejn 20 sa 25 °C.

Għandha tintuża konċentrazzjoni għolja tal-mikroorganizmi (minn 1 sa 4 g/litru ta' solidi sospiżi), u l-perjodu effettiv ta' detenzjoni huwa ta' 36 siegħa. Il-materjal karbonaċju fid-drenaġ huwa estensivament ossidizzat, normalment fi tmien siegħat wara li jkun inbeda ċ-ċiklu ta' aerjazzjoni. Wara dan, it-tajn jirrespira endogenament għall-bqijja tal-perjodu ta' aerjazzjoni, waqt dan il-perjodu l-uniku sostratt għad-dispożizzjoni huwa l-kompost tat-test sakemm dan ma jkunx diġa metabolizzat. Dawn il-fatturi, kkombinati mar-reinokulazzjoni ta' kuljum tat-test meta d-drenaġ domestiku huwa użat bħala l-materjal, jagħti kondizzjonijiet favorevoli kemm għall-akklimatizzazzjoni u l-livelli għoljin ta' biodegradazzjoni.

1.6.3. *Kif isir it-test*

Kampjun ta' tahlita minn impjant xieraq li jittratta predominalment tajn attiv jew unità tal-laboratorju huwa miksub u miżmum aerobiku sakemm dan ikun użat fil-laboratorju. Kull unità ta' aerjazzjoni kif ukoll l-unità ta' kontroll huma mimlijin b' 150ml tat-tahlita (jekk l-unità oriġinali SCAS hija użata, immultiplika l-volumi mogħtija b' 10 darbiet) u l-aerjazzjoni b'hekk tkun bdiet. Wara 23 siegħa, l-aerjazzjoni hija mwaqqfa u t-tajn jithalla joqghod għall-45 minuta. It-tapp ta' kull kontenitur jinfetħ, u għandhom jittiehdu porzjonijiet ta' 100 ml tat-tahlita supernatanta. Kampjun ta' drenaġ domestiku huma miksuba immedjatament qabel l-użu, u 100 ml għandhom jiġu miżjuda mat-tajn rimanenti f'kull unità ta' aerjazzjoni. L-aerjazzjoni għandha terġa tinbeda. F'dan l-istadju m'għandhom jiġu miżjuda l-ebda materjali tat-test, u l-unitajiet huma mitmuma kuljum bid-drenaġ domestiku biss sakemm it-tahlita supernatanta hija miksuba wara li jkun thalla jitqiegħed. Dan normalment jiehu sa ġimghatejn, li sa dak iż-żmien il-karbon organiku mahlul fit-tahlita supernatanta fl-aħhar ta' ċiklu ta' aerjazzjoni twassal għal valur kostanti.

Fit-tmiem ta' dan il-perjodu, it-tajn individwali li jkun qagħad huma mħallta, u għandu jiżdied 50 ml tat-tajn kompost li jirriżulta ma kull unità.

95 ml tad-drenaġ li jirriżulta u 5 ml ta' ilma huma miżjuda ma' l-unitajiet ta' kontroll, u 95 ml tad-drenaġ trattat u 5 ml tal-kompost xieraq tat-tahlita ta' l-istokk (400 mg/litru) huma miżjuda ma' l-unitajiet tat-test. L-aerjazzjoni għandha terġa tinbeda u tkompli għal 23 siegħa. It-Tajn imbagħad għandu jithalla joqghod għal 45 minuta u s-supernatant jittiehed u annalizzat għall-kontenut ta' karbon organiku.

Il-proċedura ta' mili u tnehhija hija ripetuta regoalment kuljum.

▼B

Qabel ma jithalla joqgħod, jaf ikun neċessarju li l-unitajiet jinaddfu sabiex jipprevjenu l-akkumulazzjoni ta' solidi 'l fuq mil-livell tal-likwidu. Barraxxa differenti għandha tintuża għal kull unità sabiex tiġi evitat l-kontaminazzjoni.

Idejalment, il-karbonju organiku mahlul fit-tahlita supernatanta hija determinata kuljum, għalkemm analiżi inqas frekwenti tista' ssir ukoll. Qabel l-analiżi, it-tahlit huma ffiltrati permezz ta' filtri tal-membrena maħsula ta' 0,45 µm jew ċċentrifugati. Il-filtri tal-membrena huma xierqa jekk huwa assigurat li dawn ma jirrilaxxawx il-karbonju jew li ma jixorbux is-sostanza fil-fażi tal-filtrazzjoni. It-temperatura tal-kampjun ma tistgħax taqbeż 1-40 °C waqt li tkun qegħdha fiċ-ċentrifugu.

It-tul tat-test tal-komposti li juru ftit jew xejn biodegradazzjoni hija indeterminata, imma l-esperjenza tissuggerixxi li din għandha tkun ta' l-anqas ta' 12-il ġimgħa, imma ta' mhux aktar minn 26 ġimgħa.

2. DATA U VALUTAZZJONI

Il-valuri tal-karbon organiku mahlul fit-tahlit supernatant ta' l-unitajiet tat-test u l-unitajiet ta' kontrol huma mpingija mal-hin.

Kif tkun qed isehh il-biodegradazzjoni, il-livell misjub fit-test għandu jersaq lejn misjub għall-kontroll. La darba d-differenza bejn iż-żewġ livelli hija misjuba bħala waħda kostanti fuq it-tlett kejljet konsekutivi, in-numru mehtieg ta' iktar kejl kif hemm bżonn sabiex ikun jista' jsir trattament statistikali tad-data u l-perċentwali tal-biodegradazzjoni tal-kompost tat-test huwa kkalkolat (D_{da} jew D_{ssd} , ara 1.2).

3. RAPPORTAĠĠ

3.1. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu, jekk possibbli, jkollu dan li ġej:

- l-informazzjoni kollha fuq it-tip ta' drenagg, t-tip ta' unitajiet użati u r-riżultati esperimentali dwar is-sostanza ttestjata, is-sostanza ta' referenza jekk użata, u l-blank,
- it-temperatura,
- il-kurva ta' tnehhija bid-deskrizzjoni, mod ta' kalkolazzjoni (ara 1.2.),
- d-data u l-lokazzjoni fejn, ittiehied il-kampjun tat-tajn attiv u d-drenagg, status ta' adattazzjoni, konċentrazzjoni, eċċ.,
- raġunijiet xjentifiċi għall-xi tibdil fil-proċedura tat-test,
- firma u data.

▼B**3.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

Minhabba li s-sostanza li għandha tiġi ttestjata b'dan il-metodu mhux ser tkun biodegradabbli minn qabel, kwalunkwe tnehhija ta' DOC minhabba l-biodegradazzjoni għandha tkun normalment gradwali fuq xi jiem jew ġimgħat, hlief f'każijiet fejn l-akklimatizzazzjoni seħh malajr kif indikat minn skompariment f'daqqa waħda li jseħh wara ftit ġimgħat.

Madankollu, l-assorbiment fiżikokemikali jista' xi kultant jkollu rwol importanti; dan huwa indikat meta jkun hemm tnehhija kompleta jew parzjali tad-DOC miżjud. Dak kollu li jiġri sussegwentement jiddependi minn fatturi bħall-grad ta' assorbiment u l-konċentrazzjoni ta' biċċiet sospiżi fl-effluwenti mormi. Generalment id-differenza bejn il-konċentrazzjoni ta' DOC fil-kontroll u t-test tat-tahlit supernatant jizjed bil-mod minn valur inizjali baxx u din id-differenza tibqa' fil-valur għid għall-bqija ta' l-esperiment, sakemm ma sseħx l-akklimatizzazzjoni.

Jekk għandha ssir distinzjoni bejn il-biodegradazzjoni (jew bijodegradazzjoni parzjali) u l-assorbiment, huma neċessarji li jsiru aktar testijiet. Dan jista' jseħh f'numru ta' modi, imma l-iktar wiehed konvinċenti huwa l-użu ta' tahlita supernatanta, jew tajn, bħala inoculum f'test bazi (preferibbilment test respiromatiku).

Is-sostanzi tat-test li jagħtu rimi mhux assobiv għoli ta' DOC għandhom jitqiesu bħala potenzalment biodegradabbli. Rimi parzjali, mhux assobiv jindika li ta' l-anqas il-kemikali huwa soġġett għal xi biodegradazzjoni.

Rimi baxx, jew xejn, ta' DOC jista' jseħh minhabba l-inibizzjoni ta' mikrorganizmi mis-sostanza tat-test u dan jista' jidher ukoll mill-leża u t-telf tat-tajn, bir-rimi ta' supernatanti turbidi. Dan it-test għandu jiġi ripetut bl-użu ta' konċentrazzjoni iktar baxxa tas-sostanza tat-test.

L-użu tal-metodu analitiku speċifiku jew ta' ^{14}C -labelled sostanza tat-test tista' tippermetti aktar sensitività. Fil-każ ta' compost tat-test ^{14}C , ir-rekupra ta' $^{14}\text{CO}_2$ għandu jikkonferma li l-biodegradazzjoni tkun seħhet.

Meta jingħataw ukoll ir-riżultati f'termini ta; biodegradazzjoni primarja, għandha tingħata, sa fejn hu possibbli, spjegazzjoni dwar it-tibdil fl-istruttura kemikali li twassal għat-telf tar-ripons mis-sostanza oriġinali tat-test.

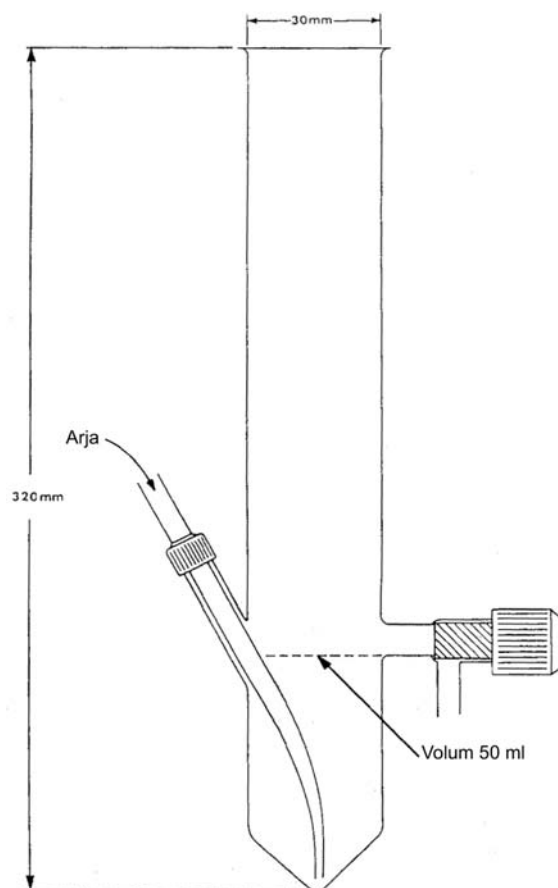
Il-validazzjoni tal-metodu analitiku għandha tingħata flimkien mar-ripons li jinstab mill-materja tat-test blank.

4. REFERENZI

- (1) OECD, Pariġi, 1981, Linji Gwida għat-Testijiet, 302 A, Deċiżjoni tal-Kunsill C(81) 30 finali.

▼B*Appendiċi I***Test SCAS: eżempju tar-riżultati**

Sostanza	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Perċentwali tal-biodegradazzjoni D_{da}	Dewmien tat-Test (ġranet)
4-acetyl sulfonat tal-aminobenzene	17,2	2,0	85	40
Sulfonat tat-tetra propylene benzene	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylene tal-glikol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentane tetra Karbossilat	17,9	3,2	81,1	120

▼B*Appendiċi 2***Eżempju ta' l-apparatus tat-test**

▼ **M7****C.13. BIJOAKKUMULAZZJONI FIL-HUT: ESPONIMENT MILWIEM U DJETETIKU****INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 305 tal-OECD (2012). L-għan ewlieni ta' din ir-reviżjoni tal-metodu ta' ttestjar jinqasam fi tnejn. L-ewwel nett, huwa maħsub sabiex jinkorpora test tal-bijoakkumulazzjoni djetetika ⁽¹⁾ xieraq sabiex jiġi stabbilit il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi b'solubilità fl-ilma baxxa hafna. It-tieni, huwa maħsub li jinhloq metodu ta' ttestjar li, meta xieraq, juża inqas hut għal raġunijiet ta' trattament xieraq tal-annimali, u dan huwa iktar kosteffikaċi.

Fis-snin ta' wara l-adozzjoni tal-metodu ta' ttestjar konsolidat C.13 (1), bosta sustanzi ġew ittestjati, u nkisbet esperjenza konsiderevoli kemm mil-laboratorji kif ukoll minn awtoritajiet regolatorji. Dan wassal għall-fehma li l-komplessità tat-test tista' titnaqqas jekk jiġu ssodisfati kriterji speċifiċi (ara l-paragrafu 88), u li huwa possibbli li jsir approċċ sekwenzjali. L-esperjenza weriet ukoll li fatturi bijoloġiċi bħat-tkabbir u l-kontenut lipidu ta' hut jista' jkollhom impatt qawwi fuq ir-riżultati u jaf ikun hemm bżonn li jiġu kkunsidrati. Barra minn hekk, ġie rikonoxxut li l-ittestjar ta' sustanzi f'tit li xejn solubbli fl-ilma jaf ma jkunx teknikament fattibbli. Barra minn hekk, għal sustanzi b'solubilità fl-ilma baxxa hafna fl-ambjent akkwatiku, l-esponiment minn ġol-ilma jista' jkollu importanza limitata meta mqabbla mar-rotta djetetika. Dan wassal għall-iżvilupp ta' metodu ta' ttestjar li fih il-hut jiġi espost permezz tad-dietta tiegħu (ara l-paragrafi 7-14 u 97 iktar 'il quddiem). Il-validazzjoni (ringtest) tat-test tal-esponiment djetetiku saret fl-2010 (51).

Il-bidliet ewlenin jinkludu:

- L-ittestjar ta' konċentrazzjoni waħda tat-test jista' jitqies li huwa bizzżejjed, meta jkun probabbli li l-fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF) ikun indipendenti mill-konċentrazzjoni tat-test.
- Disinn ta' test tal-esponiment milwiem minimizzat li fih ikun possibbli l-użu ta' numru iżgħar ta' punti tal-kampjuni, jekk ikunu ssodisfati kriterji speċifiċi.
- Il-kontenut lipidu ta' hut għandu jitkejjel sabiex il-BCF ikun jista' jiġi espress fuq bażi ta' kontenut lipidu ta' 5 %.
- Enfasi ikbar fuq l-istima tal-BCF kinetiku (meta possibbli) wara l-istima tal-BCF fl-istat kostanti.
- Għal ċerti gruppi ta' sustanzi, sejjer jiġi propost test tal-esponiment djetetiku, meta dan jitqies li huwa iktar xieraq minn test tal-esponiment milwiem.
- Il-piż tal-hut għandu jitkejjel sabiex il-BCF ikun jista' jiġi korrett għad-dilwizzjoni tat-tkabbir.

Qabel ma jsir kwalunkwe wiehed mit-testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza għat-test:

- (a) Is-sensittività tat-teknika analitika għall-kejl tat-tessut u l-konċentrazzjonijiet milwiema jew tal-ikel kemm tas-sustanza tat-test u l-metaboliti possibbli (ara l-paragrafu 65).
- (b) Is-solubilità fl-ilma [TM A.6; (2)]; dan għandu jiġi stabbilit skont metodu li huwa xieraq għall-medda (stamta) tas-solubilità sabiex jinkiseb valur affidabbli. Għal sustanzi idrofobiċi, dan ġeneralment sejjer ikun il-metodu ta' elwizzjoni tal-kolonna.

⁽¹⁾ Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

▼ M7

- (c) koeffiċjent tal-partizzjoni tal-n-Ottanol-ilma, K_{OW} ⁽¹⁾ [TMs A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)]; jew informazzjoni xierqa oħra dwar imġiba tal-partizzjonar (eż. is-sorbiment għal-lipidi, K_{OC}); dan għandu jiġi stabbilit skont metodu li huwa xieraq għall-medda (stmata) tal- K_{OW} sabiex jinkiseb valur affidabbli. Għal sustanzi idrofobiċi, dan ġeneralment se jkun il-metodu ta' thawwid bil-galbu [TM A.23 (6)];
- (d) L-istabilità tas-sustanza fl-ilma (idrolizi [TM C.7 (7)]);
- (e) L-istabilità tas-sustanza fl-ikel (speċjalment meta jintgħażel approċċ tat-test tal-esponiment djetetiku);
- (f) Informazzjoni dwar il-fototrasformazzjoni rilevanti għall-kundizzjonijiet tal-irradjazzjoni fit-test (8);
- (g) It-tensjoni fil-wiċċ (jiġifieri għal sustanzi meta l-log K_{OW} ma jkunx jista' jiġi stabbilit) [TM A.5 (9)];
- (h) Pressjoni tal-fwar [TM A.4 (10)];
- (i) Kwalunkwe informazzjoni dwar degradazzjoni bijotika jew abiotika fl-ilma, bħal (izda mhux ristretti għal) bijodegradabilità pronta (TMs C.4 partijiet II sa VII (11), C.29 (12)], fejn xieraq;
- (j) Informazzjoni dwar metaboliti: struttura, log K_{OW} , formazzjoni u degradabilità, fejn xieraq;
- (k) Kostant ta' dissoċjazzjoni tal-aċidu (pK_a) għal sustanzi li jistgħu jonizzaw. Jekk ikun hemm bżonn, il-pH tal-ilma tat-test għandha tiġi aġġustata sabiex jiġi żgurat li s-sustanza hija fil-forma mhux jonizzata fit-test jekk tkun kompatibbli mal-ispeċi tal-hut.

Indipendentement mill-metodu ta' esponiment magħżul jew l-iskema ta' kampjunar, dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi proċedura għall-karatterizzazzjoni tal-potenzjal ta' bjoakkumulazzjoni ta' sustanzi fil-hut. Għad li r-reġimi tat-test bi fluss kontinwu huma ppreferiti, reġimi semistatiċi huma permessibbli, diment li jkunu ssodisfati l-kriterji tal-validità (ara l-paragrafi 24 u 113). Fir-rotta tal-esponiment djetetiku, is-sistema tal-fluss kontinwu mhijiex neċessara sabiex jinżammu konċentrazzjonijiet milwiema tas-sustanza ttestjata, izda sejra tgħin sabiex jinżammu l-konċentrazzjonijiet adegwati ta' ossiġenu dissolt u tgħin sabiex jiġi żgurat ilma nadif u jitnehhew l-influenzi ta', pereżempju, prodotti tal-eskrezzjoni.

Indipendentement mill-metodu ta' ttestjar magħżul, jingħataw biżżejjed dettalji fil-metodu ta' ttestjar għat-twetliq tat-test filwaqt li tithalla libertà adegwata għall-adattament tad-disinn sperimentali għall-kundizzjonijiet b'mod partikolari laboratorji u għall-karatteristiċi varjabbli tas-sustanzi tat-test. It-test tal-esponiment milwiem hija applikata bl-iktar mod xieraq għal sustanzi organiċi stabbli bil-valuri tal-log K_{OW} bejn 1.5 u 6.0 (13) izda xorta wahda jista' jiġi applikat għal sustanzi ferm idrofobiċi (b'log $K_{OW} > 6.0$), jekk jista' jintwera li hemm konċentrazzjoni stabbli u kompletament dissolta tas-sustanza tat-test fl-ilma. Jekk ma jistax jintwera li hemm konċentrazzjoni stabbli tas-sustanza tat-test fl-ilma, studju milwiem ma jkunx xieraq u għalhekk ikun mehtieg approċċ djetetiku għall-ittestjar tas-sustanza fil-hut (għad li l-interpretazzjoni u l-użu tar-riżultati tat-test djetetiku jistgħu jiddependu mill-qafas regolatorju). L-istimi minn qabel

⁽¹⁾ Kultant denotat b' P_{OW} ; determinat minn metodu tat-thawwid tal-flask f'TM A.8 (4), metodu tal-HPLC f'TM A.24 (5) u metodu tat-thawwid tal-flask f'TM A.23 (6). Kultant tintuza t-teknika tal-kolonna ġeneratur għad-determinazzjoni tal-log K_{OW} . Hemm numru limitat ta' studji disponibbli li jużaw din it-teknika, primarjament għal dibenzodiossini u bifenili klorinati (eż. Li and Doucette, 1993) (3). Għal sustanzi li jistgħu jonizzaw, il-log K_{OW} għandu jirreferi għall-forma mhux jonizzata.

▼ M7

tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF, kultant imsejjah K_B) għal sustanzi organiċi b'valuri tal-log K_{OW} li jaslus sa 9.0 jistghu jinkisbu bl-użu tal-ekwazzjoni ta' Bintein *et al.*(14) L-istimi minn qabel tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni għal sustanzi tant idrofobiċi tista' tkun oghla mill-valur tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) mistenni li jinkiseb minn esperimenti tal-laboratorju, speċjalment meta jintuza mudell lineari sempliċi għall-istima minn qabel. Il-parametri li jikkarakterizzaw il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni jinkludu l-kostant tar-rata ta' teħid (k_1), il-kostanti tar-rata ta' telf inkluz il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2), il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}), il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) u l-fattur ta' bijomanifikazzjoni djetetika (BMF) (1).

Sustanzi tat-test radjotikkettati jistghu jiffaċilitaw l-analizi tal-ilma, l-ikel u l-kampjuni tal-hut u jistghu jintużaw sabiex jiġi ddeterminat jekk l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-metaboliti humiex neċessarji jew le. Jekk ir-residwi radjuattivi totali jitkejlu waħedhom (eż. b'kombustjoni jew solubilizzazzjoni tat-tessuti), il-BCF jew il-BMF huwa bbażat fuq it-total tas-sustanza prinċipali, kwalunkwe metabolit miżmum u karbonju assimiliat ukoll. Għalhekk, il-valuri tal-BCF jew il-BMF ibbażati fuq ir-residwi radjuattivi totali jaf ma jkunux direttament paragunabbli għal BCF jew BMF derivat minn analizi kimika speċifika tas-sustanza prinċipali biss. Jistghu jithaddmu proċeduri ta' separazzjoni, bħal TLC, HPLC jew GC (2) qabel l-analizi fi studji radjotikkettati sabiex jiġi stabbilit il-BCF jew il-BMF fuq il-bażi tas-sustanza prinċipali. Meta jiġu applikati t-tekniki ta' separazzjoni, għandhom isiru l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni ta' sustanza prinċipali u metaboliti rilevanti (3) (ara l-paragrafu 65) jekk il-BCF jew il-BMF sejjer ikun ibbażat fuq il-konċentrazzjoni tas-sustanza prinċipali fil-hut u mhux fuq ir-residwi radjotikkettati totali. Huwa possibbli wkoll li studju tal-metabolizmu tal-hut jew studju tad-distribuzzjoni *in vivo* jiġi kombinat ma' studju tal-bioakkumulazzjoni skont l-analizi u l-identifikazzjoni tar-residwi fit-tessuti. Il-possibbiltà ta' metabolizmu tista' titbassar b'għodod xierqa (eż. toolbox tal-QSAR tal-OECD (15) u programmi proprjetarji tal-QSAR).

Id-deċizzjoni dwar jekk it-tweġġ ta' test tal-esponiment milwiem jew djetetika, u fl-ilem ssettjar, għandha tkun ibbażata fuq il-fatturi fil-paragrafu 3 ikkunsidrati flimkien mal-qafas regolatorju rilevanti. Pereżempju, għal sustanzi, li għandhom log K_{OW} għoli izda xorta juru solubilità fl-ilma sinifikanti fir-rigward tas-sensittività ta' tekniki analitiċi disponibbli, test tal-esponiment milwiem għandu jiġi kkunsidrat qabel kollox. Madankollu, huwa possibbli li l-informazzjoni dwar is-solubilità fl-ilma mhijiex definittiva għal dawn it-tipi idrofobiċi tas-sustanzi, sabiex il-possibbiltà ta' thejġija ta' konċentrazzjonijiet milwiema dissolti stabbli li jistghu jitkejlu (emulsjonijiet stabbli mhumix permissi) applikabbli għal studju tal-esponiment milwiem għandha tiġi investigata qabel ma tittiehed deċizzjoni fuq liema metodu ta' ttestjar għandu jintuza (16). Mhuwiex possibbli li tingħata gwida preskrittiva eżatta dwar il-metodu li jrid jintuza fuq il-bażi tal-kriterji "limitu" tas-solubilità fl-ilma u l-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma, peress li fatturi oħrajn (tekniki analitiċi, degradazzjoni, assorbiment, eċċ.) jista' jkollhom influwenza qawwija fuq l-applikabilità tal-metodu għar-raġunijiet speġgati iktar 'il fuq. Madankollu, log K_{OW} ikbar minn 5 u solubilità fl-ilma ta' inqas minn ~0.01 — 0.1 mg/l jindikaw il-medda tas-sustanza fejn l-ittestjar permezz tal-esponiment milwiem jista' jsir dejjem iktar diffiċli.

Fatturi oħrajn li jistghu jinfluwenzaw l-għażla tat-test għandhom jiġu kkunsidrati, inkluz il-potenzjal tas-sustanza għall-assorbiment tar-riċipjenti tat-test u l-apparat, l-istabilità tagħha f'soluzzjoni milwiema kontra l-istabilità tagħha fl-ikel tal-hut (17) (18), eċċ.

Informazzjoni dwar aspetti prattiċi bħal dawn tista' tkun disponibbli minn studji milwiema oħrajn li saru. Iktar informazzjoni dwar l-evalwazzjoni tal-aspetti b'rabta mat-tweġġ ta' studji tal-bioakkumulazzjoni hija disponibbli fit-tagħrif (eż. (19)).

Għal sustanzi fejn is-solubilità jew iż-żamma tal-konċentrazzjoni milwiema kif ukoll l-analizi ta' dawn il-konċentrazzjonijiet ma jimponu ebda restrizzjoni għat-tweġġ ta' metodu tal-esponiment milwiem, dan il-metodu huwa ppreferut sabiex jiġi stabbilit il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanza. Xorta waħda għandu

(1) Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

(2) TLC: kromatografija fuq saff irqiq; HPLC: kromatografija likwida ta' prestazzjoni għolja; GC: kromatografija b'fazi gassuża

(3) F'ċerti oqfsa regolatorji, l-analizi tal-metaboliti tista' tkun obbligatorja meta jkun ssodisfatti ċerti kundizzjonijiet (ara l-paragrafu 65).

▼M7

jigi vverifikat li l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment milwiem li tiġi applikata taqa' fi hdan is-solubilità milwiema fil-medja tat-test. Jistgħu jintużaw metodi differenti għaż-żamma ta' konċentrazzjonijiet stabbli tas-sustanza tat-test dissolta, bħall-użu ta' soluzzjonijiet ewlenin jew sistemi tad-dożaġġ passiv (eż. metodu ta' elwizzjoni tal-kolonna), diment li jkun jista' jintwera li jistgħu jinżammu konċentrazzjonijiet stabbli u l-media tat-test mhumiex mibduln minn dawk irrakkomandati fil-paragrafu 27.

Għal sustanzi ferm idrofobiċi ($\log K_{OW} > 5$ u solubilità ta' inqas minn $\sim 0,01-0,1$ mg/l), l-ittestjar permezz tal-esponiment milwiem jista' jsir dejjem iktar diffiċli. Ir-raġunijiet għar-restrizzjonijiet jistgħu jkunu li l-konċentrazzjonijiet milwiema ma tistax tinżamm f'livell li jitqies li huwa kostanti biżżejjed (eż. dovut għas-sorbiment għall-ħġieġ tal-kontenituri tal-esponiment jew it-tehid rapidu mill-hut) jew li l-konċentrazzjonijiet milwiema li sejin jigu applikati tant huma baxxi li jaqgħu fl-istess medda daqs jew inqas mil-limitu analitiku ta' kwantifikazzjoni⁽¹⁾. Għal dawn is-sustanzi ferm idrofobiċi, it-test djetetiku huwa rakkomandat, diment li t-test ikun konsistenti mal-qafas regolatorju rilevanti u l-ħtiġijiet ta' valutazzjoni tar-riskji.

Għal aġenti tensjoattivi, għandu jiġi kkunsidrat jekk it-test tal-bijokonċentrazzjonijiet milwiema huwiex fattibbli, fid-dawl tal-proprietajiet tas-sustanza, inkella aktarx li studju djetetiku jkun iktar adattat. L-aġenti tensjoattivi huma aġenti li jaġixxu fil-wiċċ, li jbaxxu t-tensjoni interfaċjali bejn żewġ likwidi. L-ghamla amfifilika tagħhom (jiġifieri fihom parti idrofilika u parti idrofobika) tikkaġuna sabiex dawn jakkumulaw f'interfaċċji bħall-interfaċċja ilma-arja, l-interfaċċja ilma-ikel, u hitan tal-ħġieġ, xi haġa li xxekkel id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet milwiema tagħhom.

It-test djetetiku jista' jevita whud mill-aspetti tal-esponiment għal tahlitiet kumplessi b'komponenti ta' limiti differenti tas-solubilità fl-ilma, peress li esponiment komparabbli għall-komponenti kollha tat-tahlita għandu probabbiltà ikbar li jsehh fil-metodu milwiem (ara (20)).

Ta' min jgħid li l-approċċ djetetiku jrendi fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetiku (BMF) minflok fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF)⁽²⁾. Hemm approċċi disponibbli sabiex jiġi stmat fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) minn dejta ġġenerata fl-istudju djetetiku (kif diskuss fl-Appendiċi 8, izda dawn l-approċċi għandhom jintużaw bil-galbu). B'mod ġenerali, dawn l-approċċi jassumu kinetika tal-ewwel ordni u huma applikabbli biss għal ċerti gruppi ta' komposti. Huwa improbabli li t-tali approċċi jistgħu jiġu applikati għal aġenti tensjoattivi (ara l-paragrafu 12).

Test tal-esponiment milwiem minimizzat issettjat b'inqas punti tal-kampjunar sabiex jitnaqqas in-numru ta' annimali u/jew riżorsi (ara l-paragrafu 83 u ta' warajh) għandu jiġi applikat biss għal dawk is-sustanzi meta jkun hemm raġuni għaliex wiehed jistenna li t-tehid u d-depurazzjoni sejin isegwu kinetika tal-ewwel ordni bejn wiehed u iehor (jiġifieri b'mod ġenerali sustanzi organiċi mhux jonizzati, ara l-paragrafu 88).

C.13 — I TEST TAL-BIJOKONĊENTRAZZJONI TAL-ESPOSIZZJONI MILWIEMA FIL-HUT

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

It-test jikkonsisti f'zewġ fażijiet: il-fażijiet tal-esponiment (tehid) u ta' wara l-esponiment (tisfija). Matul il-fażi ta' tehid, grupp ta' hut ta' speċi waħda jiġi espost għas-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni magħżula waħda jew iktar, skont il-proprietajiet tas-sustanza tat-test (ara l-paragrafu 49). Imbagħad jiġu trasferiti għal medium mingħajr is-sustanza tat-test għall-fażi ta' tisfija. Fażi ta' tisfija dejjem tkun meħtieġa sakemm it-tehid tas-sustanza matul il-fażi ta' tehid ma kienx insinifikanti. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test go/fuq il-hut (jew it-tessut speċifiku tiegħu) tiġi segwita matul iż-żewġ fażijiet tat-test. Minbarra l-grupp espost, grupp tal-kontroll tal-hut jinżamm f'kundizzjonijiet identiċi hlief

⁽¹⁾ B'mod ġenerali, il-konċentrazzjonijiet imkejlin fl-ilma matul il-fażi ta' tehid għandhom ikunu tal-inqas l'ordni ta' kobar ikbar mil-limitu tal-kwantifikazzjoni sabiex ikunu jistgħu jitkejlu iktar minn nofs haġa waħda tal-preżenza fil-ġisem fil-fażi ta' tisfija tal-istudju.

⁽²⁾ Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

▼ M7

għan-nuqqas tas-sustanza tat-test, sabiex jiġu konnessi effetti avversi possibbli osservati fit-test tal-bijokoncentrazzjoni għal grupp tal-kontroll li jaqbel u sabiex jinkisbu konċentrazzjonijiet ta' sfond tas-sustanza tat-test⁽¹⁾.

Fit-test tal-esponiment milwiem, il-fażi ta' teħid normalment tinfirex fuq 28 jum. Id-durata tista' tittawwal jekk ikun hemm bżonn (ara l-paragrafu 18), jew titqassar jekk jintwera li l-istat stazzjonarju ntlahaq qabel (ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet) Tbassir tat-tul tal-fażi ta' teħid u l-hin għall-istat stazzjonarju jista' jsir bl-ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 5. Imbagħad jibda l-perjodu ta' tisfija li fih il-hut ma jibqax espost għas-sustanza tat-test, billi l-hut jiġi ttrasferit fl-istess medium iżda mingħajr is-sustanza tat-test f'reċipjent nadif. Meta dan ikun possibbli, il-fattur ta' bijokoncentrazzjoni jiġi kkalkolat kemm bħala l-proporzjon tal-koncentrazzjoni fil-hut (C_f) u fl-ilma (C_w) fi stat stazzjonarju (BCF_{SS} ; ara l-Appendiċi 1, definizzjoni) u bħala fattur ta' bijokoncentrazzjoni kinetika (BCF_K ; ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet), li huwa stmat bħala l-proporzjon tal-kostanti tar-rata ta' teħid (k_1) u t-tisfija (k_2) filwaqt li tiġi supponuta kinetika tal-ewwel ordni⁽²⁾

Jekk ma jinkisibx stat stazzjonarju fi żmien 28 jum, il-BCF jiġi kkalkolat bl-użu tal-approċċ kinetiku (ara l-paragrafu 38) jew inkella tista' tiġi estiża l-fażi ta' teħid. Jekk dan iwassal għal fażi ta' teħid twila wisq tant li tkun imprattika sakemm jintlahaq l-istat stazzjonarju (ara l-paragrafi 37 u 38, l-Appendiċi 5), l-approċċ kinetiku huwa ppreferut. Inkella, għal sustanzi ferm idrofobiċi, it-twertiq ta' studju djetetiku għandu jiġi kkunsidrat⁽³⁾, diment li t-test djetetiku jkun konsistenti mal-qafas regolatorju rilevanti.

Il-kostant tar-rata ta' teħid, il-kostant (jew il-kostanti, fejn ikunu involuti mudelli aktar kumplessi) tar-rata ta' tisfija (telf), il-fattur ta' biokoncentrazzjoni (fi stat stazzjonarju u/jew kinetika), u fejn huwa possibbli, il-limiti tal-kunfidenza ta' kull wiehied minn dawn il-parametri huma kkalkolati mill-mudell li jiddeskrivi bl-aħjar mod il-koncentrazzjonijiet imkejl in tas-sustanza tat-test fil-hut u l-ilma (ara l-Appendiċi 5).

Iż-zieda fil-massa tal-hut matul it-test sejra tirriżulta fi tnaqqis fil-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut li qiegħed jikber (l-hekk imsejha dilwizzjoni tat-tkabbir), u b'hekk il-BCF kinetiku sejjer jiġi sottovalutat jekk ma jiġix ikkoreġut għat-tkabbir (ara l-paragrafi 72 u 73).

Il-BCF huwa bbażat fuq il-koncentrazzjoni totali fil-hut (jiġifieri għal kull piż niedi totali tal-hut). Madankollu, għal għanijiet speċjali, jistgħu jintużaw tessuti jew organi speċifiċi (eż. muskolu, fwied) jekk il-hut ikun kbir biżżejjed jew jekk il-hut ikun jista' jinqasam fi frazzjonijiet li jittiekle (fletti) u li ma jittieklux (vixxri). Ladarba, għal hafna sustanzi organiċi, hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzjal għall-bijokoncentrazzjoni u l-idrofobicità, hemm ukoll relazzjoni korrispondenti bejn il-kontenut tal-lipidu tal-hut tat-test u l-bijokoncentrazzjoni osservata tat-tali sustanzi.

⁽¹⁾ Għal hafna mis-sustanzi tat-test, idealment ma għandu jkun hemm ebda individwazzjoni fl-ilma tal-kontroll. Il-koncentrazzjonijiet ta' sfond għandhom ikun rilevanti biss għal materjali li jsehhu naturalment (eż. ċerti metalli) u sustanzi li ssibhom faċilment fl-ambjent.

⁽²⁾ Jekk ikun ovvj u li l-kinetika tal-ewwel ordni mhijiex segwita, għandhom jintużaw mudelli iktar kumplessi (ara referenzi fl-Appendiċi 5 u għandu jittfittex parir mingħand esperti tal-bijostatistika.

⁽³⁾ It-teħid jista' jkun limitat minn konċentrazzjonijiet tal-esponiment baxxi minhabba s-solubilità baxxa fl-ilma fit-test ta' bijokoncentrazzjoni, filwaqt li jistgħu jinkisbu konċentrazzjonijiet tal-esponiment ferm oghla bit-test djetetiku.

▼ **M7**

B'hekk, sabiex jonqos dan is-sors ta' varjabbiltà fir-riżultati tat-test għal dawk is-sustanzi b'lipofiliċità għolja (jiġifieri $\log K_{OW} > 3$), il-bijokonċentrazzjoni għandha tkun espressa bħala normalizzata għal hut b'kontenut lipidu ta' 5 % (fuq il-bażi tal-piż niedi tal-gisem shih) minbarra dik derivata direttament mill-istudju. Dan huwa neċessarju sabiex tiġi pprovduta bażi li fuqha jistgħu jitqabblu ma' xulxin ir-riżultati għal sustanzi u/jew speċijiet tat-test differenti. Il-figura ta' kontenut lipidu ta' 5 % intużat spiss peress li tirrappreżenta l-kontenut lipidu medju ta' hut użat spiss f'dan il-metodu ta' ttestjar (21).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Minbarra l-proprietajiet tas-sustanza tat-test mogħtija fl-Introduzzjoni (paragrafu 3), informazzjoni oħra meħtieġa hija t-tossiċità għall-ispeċi tal-hut li sejra tintuża fit-test, idealment l-LC₅₀ asintomatika (jiġifieri indipendenti mill-hin) u/jew it-tossiċità stmata mit-testijiet fil-hut fit-tul (eż. TMs C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Metodu analitiku xieraq, ta' reqqa, preċiżjoni u sensittività magħrufin, għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test u f'materjal bioloġiku għandu jkun disponibbli, flimkien mad-dettalji tal-preparazzjoni tal-kampjun u tal-hażna. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni analitika tas-sustanza tat-test kemm fl-ilma kif ukoll fit-tessuti tal-hut għandu jkun magħruf ukoll. Meta tintuża sustanza tat-test radjotikkettata, għandha tkun tal-ogħla purità (eż. idealment > 98 %) u l-perċentwal tar-radjuattività assoċjat mal-impuritajiet għandu jkun magħruf.

VALIDITÀ TAT-TEST

Sabiex test ikun validu, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

Il-varjazzjoni fit-temperatura tal-ilma hija inqas minn ± 2 °C, għaliex devjazzjonijiet kbar jistgħu jaffettwaw il-parametri bijoloġiċi rilevanti għat-tehid u t-tisfija kif ukoll jikkawżaw stress għall-annimali;

Il-konċentrazzjoni tal-ossigenu dissolt ma taqax taht saturazzjoni ta' 60 %;

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-kompartimenti tinżamm fi hdan ± 20 % tal-medja tal-valuri mkejlin matul il-fażi ta' tehid,

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija taht il-limitu ta' solubilità tagħha fl-ilma, filwaqt li jitqies l-effett li jista' jkollu l-ilma tat-test fuq is-solubilità effettiva ⁽¹⁾;

Il-mortalità jew effetti avversi oħrajn/mard kemm fil-hut tal-kontroll kif ukoll dak tat-trattament huma inqas minn 10 % fi tmiem it-test; fejn it-test jiġi estiż tul hafna ġimghat jew xhur, mewt jew effetti avversi oħrajn fiż-żewġ settijiet tal-hut għandhom ikunu inqas minn 5 % fix-xahar u ma jaqbzux it-30 % b'kollox. Differenzi sinifikanti fit-tkabbir medju bejn il-gruppi tat-test u tal-kontroll tal-hut kampjunat jistgħu jkunu indikazzjoni ta' effett tossiku tas-sustanza tat-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

L-użu ta' sustanzi ta' referenza b'potenzjal ta' bijokonċentrazzjoni magħruf u metabolizmu baxx ikun siewi fil-verifika tal-proċedura sperimentali, meta tkun meħtieġa (eż. meta laboratorju ma jkollu ebda esperjenza fl-imġhoddi bit-test jew ikunu nbidlu l-kundizzjonijiet tal-esperiment).

⁽¹⁾ Għal sustanzi multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet, għandha tiġi kkunsidrata s-solubilità fl-ilma ta' kull komponent rilevanti sabiex jiġu stabbiliti l-konċentrazzjonijiet tal-esponent xierqa.

▼ M7

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

Ghandha tinghata attenzjoni sabiex jiġi evitat l-użu tal-materjali — għall-partijiet kollha tat-tagħmir — li jistgħu jiddissolvu, jassorbu jew jillixxivjaw u jkollhom effett avvers fuq il-hut. Jistgħu jintużaw tankijiet standard rettangolari jew ċilindriċi, magħmula minn materjal kimikament inerti u b'kapacità adatta b'konformità mar-rata ta' tagħbija (ara l-paragrafu 43). L-użu ta' tubi tal-plastik rotob għandu jittnaqqas kemm jista' jkun. Għandhom jintużaw tubi tal-politetrafluoroetilen, tal-azzar inossidabbli u/jew tal-ħġieg. L-esperjenza wriet li għal sustanzi tat-test b'koeffiċjent ta' assorbiment għoli, bħall-piretrojdi sintetiċi, jista' jkun meħtieġ ħġieg silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir għandu jintrema wara li jintuża. Idealment is-sistemi tat-test jiġu esposti għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test li sejr in jintużaw fl-istudju għat-tul ta' żmien methieġ sabiex tintwera ż-żamma ta' konċentrazzjonijiet tal-esponiment stabbli qabel l-introduzzjoni tal-organiżmi tat-test.

Ilma

Generalment fit-test jintuża ilma naturali u dan għandu jinkiseb minn sors mhux ikkontaminat u ta' kwalità uniformi. Izda ilma rikostitwit (jiġifieri ilma demineralizzat b'nutrijenti speċifiċi miżjudin f'ammonji magħrufin) jista' jkun iktar adattat sabiex jiggarantixxi kwalità uniformi tul iż-żmien. L-ilma tad-dilwizzjoni, li huwa l-ilma li jiġihallat mas-sustanza tat-test qabel ma tidhol fir-riċipjent tat-test (ara l-paragrafu 30), għandu jkun ta' kwalità li tippermetti li l-ispeċi tal-hut magħżula tibqa' hajja għad-durata tal-perjodu ta' akklimatizzazzjoni u l-perjodi tat-test mingħajr ma turi ebda dehra jew imġiba anormali. Idealment, għandu jintwera li l-ispeċi tat-test tista' tibqa' hajja, tikber u tirriproduċi fl-ilma ta' dilwizzjoni (eż. fil-kultura tal-laboratorju jew test tat-tossità taċ-ċiklu tal-hajja). L-ilma ta' dilwizzjoni għandu jkun karatterizzat mill-inqas minn pH, ebusija, solidi totali, karbonju organiku totali (TOC⁽¹⁾) u, preferibbilment ammonju wkoll, nitrit u alkalinità u, għall-ispeċijiet marini, is-salinità. Il-parametri li huma importanti għall-aktar trattament xieraq tal-hut mhumex magħrufin kollha, izda l-Anness 2 jagħti l-konċentrazzjonijiet massimi rakkomandati għal numru ta' parametri għal ilmiġiet helwin u marittimi tat-test.

L-ilma ta' dilwizzjoni għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu ta' test. Il-valur tal-pH għandu jkun fil-medda ta' 6.0 sa 8.5 fil-bidu tat-test, izda matul test speċifiku għandu jkun f'medda ta' ± 0.5 tal-unitajiet tal-pH. Sabiex ikun żgurat li d-dilwizzjoni tal-ilma mhijiex sejra tinfluwenza għalxejn ir-riżultat tat-test (pereżempju, bil-kumplessazzjoni tas-sustanza tat-test) jew taffettwa b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk tal-hut, għandhom jittieħdu kampjuni kull ċertu żmien għall-analiżi, tal-inqas fil-bidu u fi tmiem it-test. Meta jkun magħruf li l-ilma tad-dilwizzjoni huwa relattivament kostanti fil-kwalità, għandhom jiġu determinati l-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, u Ni), ta' anjoni u katjoni ewlenin (eż. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , u SO_4^{2-}), ta' pesticidi (eż. pesticidi organofosforiċi totali u pesticidi organoklorurati totali), ta' karbonju organiku u ta' solidi sospizi totali, pereżempju kull tliet xhur. Jekk ikun intwera li l-kwalità tal-ilma ta' dilwizzjoni hija kostanti għal tal-anqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas spissi u l-intervalli jistgħu jittawlu (eż. kull sitt xhur).

Il-kontenut tal-partiċelli naturali kif ukoll il-karbonju organiku totali tal-ilma ta' dilwizzjoni għandu jkun baxx kemm jista' jkun sabiex jiġi evitat assorbiment tas-sustanza tat-test għal materja organika, li jista' jnaqqas il-bijodisponibilità tiegħu u b'hekk jirriżulta f'sottovalutazzjoni tal-BCF. Il-valur massimu aċċettabbli huwa

⁽¹⁾ It-TOC jinkludi karbonju organiku minn partiċelli u karbonju organiku dissolt, jiġifieri $\text{TOC} = \text{POC} + \text{DOC}$.

▼ M7

ta' 5 mg/l għall-oġġett partikolari (oġġett niexef/xott, li ma jgħaddix il-filtru ta' 0.45 µm) u 2 mg/l għall-karbonju totali organiku (ara Anness 2). Jekk hemm bżonn, l-ilma ta' dilwizzjoni għandu jiġi filtrat qabel l-użu. Il-kontribuzzjoni għall-kontenut ta' karbonju organiku fl-ilma tat-test mill-hut tat-test (eskrezzjonijiet) u mir-residwi fl-ikel għandha tinzamm baxxa kemm jista' jkun (ara l-paragrafu 46).

Soluzzjonijiet tat-Test

Hejji soluzzjoni ewlenija tas-sustanza tat-test f'koncentrazzjoni adattata. Idealment is-soluzzjoni ewlenija tithejja billi s-sustanza tat-test tiġi semplicement imħallta u mheżża fl-ilma ta' dilwizzjoni. Alternattiva li tista' tkun xierqa f'ċerti każijiet hija l-użu ta' sistema ta' dożaġġ ta' desorbiment tal-fażi solida. Generalment mhuwiex rakkomandat li jintużaw solventi u agenti dispersivi (agenti solubilizzanti) (ara (25)); madankollu, l-użu ta' dawn il-materjali jista' jkun aċċettabbli sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkoncentrata kif suppost, iżda għandu jsir kull sforz sabiex jitnaqqas kemm jista' jkun l-użu tat-tali materjali u l-koncentrazzjoni kritika ta' miċelli ma għandhiex tinqabeż (jekk rilevanti). Solventi li jistgħu jintużaw huma l-aċeton, l-etanol, il-metanol, il-formamid tad-dimetil u l-glikol tat-trietilen; agenti dispersivi li ntużaw huma Tween 80, metilċelluloża 0.01 % u HCO-40. Il-koncentrazzjoni tas-solvent fil-medium tat-test finali għandha tkun l-istess fit-trattamenti kollha (jiġifieri tkun xi tkun il-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test) u ma għandhiex taqbeż il-limiti tat-tossiċità korrispondenti stabbiliti għas-solvent fil-kundizzjonijiet tat-test. Il-livell massimu huwa konċentrazzjoni ta' 100 mg/l (jew 0.1 ml/l). Huwa improbabbli li konċentrazzjoni tas-solvent ta' 100 mg/l sejra tibdel b'mod sinifikanti l-koncentrazzjoni dissolta massima tas-sustanza tat-test li tista' tinkiseb fil-medium (25). Il-kontribuzzjoni tas-solvent (flimkien mas-sustanza tat-test) għall-kontenut kollu tal-karbonju organiku fl-ilma tat-test għandha tkun magħrufa. Matul it-test, il-koncentrazzjoni ta' karbonju organiku totali fir-riċipjenti tat-test ma għandhiex taqbeż il-koncentrazzjoni ta' karbonju organiku li joriġina mis-sustanza tat-test u, jekk jintuża s-solvent jew l-agent solubilizzanti⁽¹⁾, b'aktar minn 10 mg/l ($\pm 20\%$). Il-kontenut ta' materja organika jista' jkollu effett sinifikatni fuq l-ammont ta' sustanza tat-test dissolta liberament matul it-testijiet fuq il-hut bi fluss kontinwu, speċjalment għal sustanzi ferm lipofiliċi. Il-mikroestrazzjoni tal-fażi solida (ara l-paragrafu 60) tista' tipprovdri informazzjoni importanti fuq il-proporzjon ta' bejn il-komposti mqabbdin u dawk dissolti liberament, li fosthom dawn tal-aħhar huma supponuti li jirrappreżentaw il-frazzjoni bijodisponibbli. Il-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun inqas mil-limitu ta' solubilità tas-sustanza tat-test fil-media tat-test minkejja l-użu ta' solvent jew agent solubilizzanti. Għandha tingħata attenzjoni meta jintużaw solventi bijodigradabbli lesti peress li dawn jistgħu jikkawżaw problemi bit-tkabbir ta' batterji fit-testijiet bi fluss kontinwu. Jekk mhuwiex possibbli li tithejja soluzzjoni ewlenija mingħajr ma jintuża agent solubilizzanti, għandha tiġi kkunsidrata l-idoneità ta' studju ta' esponiment milwiem għall-kuntrarju ta' studju ta' esponiment djetetiku.

Għat-testijiet bi fluss kontinwu, sistema li kontinwament tiddistribwixxi u tiddilwixxi soluzzjoni ewlenija tas-sustanza tat-test (eż. pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) jew sistema ta' dożaġġ ta' desorbiment tal-fażi solida hija mehtieġa sabiex tforni l-koncentrazzjonijiet tat-test fil-kompartimenti tat-test. Idealment, għandhom jithallew jgħaddu tal-inqas hames sostituti tal-volum minn kull kompartment tat-test kuljum. Il-modalità tal-fluss kontinwu għandha tkun ippreferuta, iżda fejn din mhijiex possibbli (eż. fejn l-organizmi tat-test ikunu affettwati b'mod avvers), tista' tintuża teknika semistatika ladarba jkunu ssodisfati l-kriterji ta' validità (ara l-paragrafu 24). Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-ilma ta' dilwizzjoni għandhom ikunu kkontrollati kemm 48 siegħa qabel kif ukoll tal-inqas kuljum matul it-test wara dan. Inkludi f'dan il-kontroll id-determinazzjoni tar-rata tal-fluss minn ġewwa kull kompartment tat-test u ara li din ma tvarjax b'aktar minn 20 % fi hdan l-istess kompartment jew bejn kompartmenti differenti.

⁽¹⁾ Għad li generalment dan mhuwiex rakkomandat, jekk jintuża solvent jew agent solubilizzanti, il-karbonju li joriġina minn dan l-agent għandu jiġi ddied mal-karbonju organiku mis-sustanza tat-test sabiex tiġi evalwata l-koncentrazzjoni tal-karbonju organiku fir-riċipjenti tat-test.

▼ **M7****L-ghażla tal-ispeċijiet**

Kriterji importanti fl-ghażla tal-ispeċi huma li dejjem ikunu lesti għad-dispożizzjoni, jistgħu jtkisbu f'daqsijiet konvenjenti u jistgħu jinżammu b'mod sodisfacenti fil-laboratorju. Kritejri oħrajn għall-ghażla tal-ispeċi tal-hut jinkludu importanza rikreazzjonali, kummerċjali u ekoloġika kif ukoll is-sensittività komparabbli, l-użu b'suċċess fl-imghoddi, eċċ. Fl-Appendiċi 3 jingħataw l-ispeċijiet tat-test rakkomandati. Jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn iżda l-proċedura tat-test jista' jkollha tiġi adattata sabiex tipprovi kundizzjonijiet xierqa tat-test. F'dan il-kaz, ir-raġuni li tiġġustifika l-ghażla tal-ispeċi u l-metodu sperimentali għandhom jiġu rrapportati. B'mod ġenerali, l-użu ta' speċijiet ta' hut iżgħar sejjer iqassar il-hin għall-istat stazzjonarju, iżda jista' jkun hemm bżonn ta' iktar hut (kampjuni) sabiex jiġu analizzati l-kontenut lipidu u l-koncentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test b'mod adegwat fil-hut. Barra minn hekk, huwa possibbli li differenzi fir-rata ta' respirazzjoni u metabolizmu bejn hut iżgħar u ikbar fl-età jistgħu jxekklu l-paraguni tar-risultati bejn testijiet differenti u speċijiet tat-test differenti. Ta' min jinnota li l-ispeċi tal-hut ittestjata fi stadju tal-hajja bi tkabbir rapidu (meta jkun għadu qed jikber) jista' jikkomplica l-interpretazzjoni tad-dejta.

Iż-żamma tal-hut (rilevanti għall-esponiment milwiem u djetetika)

Il-popolazzjoni tal-istokk tal-hut għandha tithalla dderri għal tal-inqas ġimagħtejn fl-ilma (ara l-paragrafu 28) fit-temperatura u l-ġhalf tat-test fuq dieta suffiċjenti (ara l-paragrafu 45). Kemm l-ilma kif ukoll id-dieta għandhom ikunu tal-istess tip bħal dawk li sejjrin jintużaw matul it-test.

Wara perjodu ta' 48 siegħa li fih il-hut jithallew joqogħdu, jiġu rreġistrati l-mortalitajiet u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

- Mortalitajiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni fsebat ijiem: iċċad il-lott shih;
- Mortalitajiet ta' bejn 5 u 10 % tal-popolazzjoni fsebat ijiem: hallihom iderru għal sebat ijiem oħra — jekk ikun hemm mortalità oghla minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, iċċad il-lott shih;
- Mortalitajiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni fsebat ijiem: aċċetta l-lott shih.

Il-hut użat fit-testijiet għandu jkun hieles minn mard u anormalitajiet osservabbli. Kwalunkwe hut marid għandu jitwarrab. Il-hut ma għandux jirċievi trattament għall-mard fil-ġimagħtejn ta' qabel it-test, jew matul it-test.

IT-TWETTIQ TAT-TEST**Test preliminari**

Jista' jkun siewi li jsir esperiment preliminari sabiex jiġu ottimizzati l-kundizzjonijiet tat-test tat-test definittiv, eż. l-ghażla ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test, id-durata tal-fażijiet ta' tehid u ta' tisfija, jew sabiex jiġi stabbilit jekk hemmx bżonn li jsir test shih. Id-disinn tat-test preliminari għandu jkun tali li tinkiseb l-informazzjoni metieġa. Jista' jiġi kkunsidrat jekk test minimizzat jista' jkun bizzejjed għall-kisba ta' BCF, jew jekk ikun hemm bżonn li jsir studju shih (ara l-paragrafi 83-95 fuq it-test minimizzat).

Kundizzjonijiet tal-Esponiment*Durata tal-fażi ta' tehid*

Tbassir tad-durata tal-fażi ta' tehid jista' jinkiseb mill-esperjenza Prattika (eż. minn studju preċedenti jew studju tal-akkumulazzjoni fuq sustanza relatata strutturalment) jew minn ċerti relazzjonijiet empiriċi li jużaw għarfien jew dwar is-solubilità fl-ilma jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanza tat-test (diment li t-tehid isegwi l-kinetika tal-ewwel ordni, ara l-Appendiċi 5).

▼ M7

Il-fażi ta' tehid għandha ssir għal 28 jum sakemm ma jkunx jista' jintwera li l-istat stazzjonarju ntlahaq qabel (ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet). Stat stazzjonarju jintlahaq fil-plott tas-sustanza tat-test fil-hut (C_f) kontra l-hin meta l-kurva ssir parallela għall-assi tal-hin u tlett analizijiet suċċessivi tas- C_f magħmula fuq kampjuni meħuda fl-intervalli ta' mill-inqas jumejn huma fi hdan $\pm 20\%$ minn xulxin, u ma hemmx żieda sinifikanti ta' C_f fil-hin bejn l-ewwel u l-aħħar analizi suċċessivi. Meta jiġu analizzati l-kampjuni miġbura flimkien, hemm bżonn ta' mill-inqas erba' analizijiet suċċessivi. Għas-sustanzi tat-test li jittiehdu bil-mod, ikun aktar xieraq li l-intervalli jkunu ta' sebat ijiem. Jekk l-istat stazzjonarju ma jintlahaqx sal-jum 28, il-BCF jiġi kkalkolat bl-użu tal-approċċ kinetiku biss, li ma jiddependix mill-ilħuq tal-istat stazzjonarju, jew inkella l-fażi ta' tehid tista' tiġi estiża, sabiex jittiehdu iktar kejljet, sakemm jintlahaq l-istat stazzjonarju jew għal 60 jum, skont liema minnhom ikun l-iqsar. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut fi tmiem il-fażi ta' tehid trid tkun għolja biżżejjed sabiex tiġi żgurata stima affidabbli ta' k_2 mill-fażi ta' tisfija. Jekk ma jkunx hemm tehid sinifikanti wara 28 jum, it-test jista' jitwaqqaf.

Durata tal-fażi ta' tisfija

Għal sustanzi li jseguw l-kinetika tal-ewwel ordni, perjodu ta' nofs id-durata tal-fażi ta' tehid normalment ikun biżżejjed sabiex isehh tnaqqis xieraq (eż. 95 %) fil-preżenza fil-ġisem tas-sustanza (ara l-Appendiċi 5 għall-ispejgazzjoni tal-istima). Jekk il-hin mehtieg biex jintlahaq it-telf ta' 95 % ikun twil b'mod impratiku, għaliex pereżempju jaqbez bid-doppju d-durata normali tal-fażi ta' tehid (jiġifieri iktar minn 56 jum), jista' jintuża perjodu iqsar (eż. sakemm il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tiġi inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni tal-istat stazzjonarju). Madankollu, jista' jkun hemm bżonn ta' perjodi ta' tisfija itwal għal sustanzi b'mudelli iktar kumplessi ta' tehid u tisfija minn dawk rappreżentati minn mudell tal-hut b'kompartiment wiehed li jrendi kinetika tal-ewwel ordni. Jekk jiġu osservati u/jew antiċipati xejriet kumplessi bħal dawn, huwa rakkomandat li jitfittex li jinkiseb parir mingħand esperti tal-bijostatistika u/jew tal-farmakokinetika sabiex jiġi żgurat issettjar xieraq tat-test. Peress li l-perjodu ta' tisfija huwa estiż, in-numri ta' hut għall-kampjunar jista' jkun fattur ta' limitazzjoni u d-differenzi fit-tkabbir bejn il-hut jistgħu jinfluwenzaw ir-riżultati. Il-perjodu sejjer jiġi rregolat ukoll mill-perjodu li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut tibqa' oghla mil-limitu analitiku tal-kwantifikazzjoni.

Numri ta' hut tat-test

Aghżel in-numri ta' hut għal kull konċentrazzjoni tat-test b'tali mod li jkun hemm minimu ta' erba' hutiet disponibbli f'kull punt tal-kampjunar. Il-hut għandu jingabar flimkien biss jekk l-analizi ta' huta waħda ma tkunx fattibbli. Jekk ikun hemm skop ta' preċiżjoni ikbar fl-iffittjar tal-kurva (u l-parametri derivati) jew jekk ikun hemm bżonn ta' studji dwar il-metaboliżmu (eż. sabiex issir distinzjoni bejn metaboliti u sustanzi prinċipali meta jintużaw sustanzi tat-test radjotikkettati), sejjer ikun hemm bżonn ta' iktar hut għal kull punt tal-kampjunar. Il-kontenut lipidu għandu jiġi determinat fuq l-istess materjal bijoloġiku li jintuża sabiex tiġi determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test. Jekk dan ma jkunx fattibbli, jista' jkun hemm bżonn ta' iktar hut (ara l-paragrafi 56 u 57).

Jekk jintuża hut adult (jiġifieri li lahaq il-maturità sesswali), dan ma għandux ikun fi stat riproduttiv jew irriproduċa dan l-aħħar (jiġifieri diġà rriproduċa) la qabel u lanqas matul it-test. Għandu jiġi rrapportat ukoll jekk jintużawx irġiel jew nisa jew jekk tintużax tahlita ta' dawn fl-esperiment. Jekk jintużaw iż-żewġ sessi, id-differenzi fit-tkabbir u l-kontenut lipidu bejn is-sessi għandu jkun dokumentat bħala mhux sinifikanti qabel ma jibda l-esperiment, speċjalment jekk ikun antiċipat li l-gbir flimkien tal-hut irġiel u nisa sejjer ikun neċessarju sabiex jiġi żgurati konċentrazzjonijiet tas-sustanza u/jew kontenut lipidu identifikabbli.

▼ **M7**

Fi kwalunkwe test, aghzel hut b'piz simili b'tali mod li l-izghar ma jkunux izghar minn zewg terzi tal-piz tal-ikbar. Ilkoll ghandhom ikunu tal-istess sena-klassi u gzejn mill-istess sors. Peress li l-piz u l-età ta' huta jista' jkollhom effetti importanti fuq il-valuri tal-BCF (12) dawn id-dettalji ghandhom jigu rreġistrati b'mod preċiż. Huwa rakkomandat li sottokampjun tal-istokk tal-hut jintiżen ftit qabel ma jibda t-test sabiex jiġi smat il-piz medju (ara l-paragrafu 61).

Tagħbija

Ghandhom jintużaw proporzjonijiet gholjin ta' ilma għall-hut sabiex jonqos it-tnaqqis fil-koncentrazzjoni tal-kompost tat-test fl-ilma kkaġunat miż-zieda tal-hut fil-bidu tat-test u anki sabiex jiġi evitat tnaqqis fil-koncentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt. Huwa importanti li r-rata ta' tagħbija tkun adattata għall-ispeċi tat-test użata. F'kull każ, normalment tkun rakkomandata rata ta' tagħbija hut-ilma ta' 0.1-1.0 g hut (piz niedi) għal kull litru fil-ġurnata. Jistgħu jintużaw rati oghla ta' tagħbija hut-ilma jekk jintwera li l-koncentrazzjonijiet meħtieġa tas-sustanza tat-test jistgħu jinżammu f'limiti ta' $\pm 20\%$, u li l-koncentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt ma taqax taħt 60 % saturazzjoni (ara l-paragrafu 24).

Meta tagħzel ir-reġimi tat-tagħbija xierqa, qis il-habitat normali tal-ispeċi tal-hut. Pereżempju, hut li jgħix fil-qiegh jista' jirrikjedi qiegh tal-akkwarju ikbar għall-istess volum ta' ilma meta mqabbel ma' speċi ta' hut pelagiku.

Għalf

Matul il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni u tat-test, itma' dieta xierqa ta' lipidu magħruf u kontenut totali ta' proteina lill-hut f'ammont biżżejjed sabiex jibqgħu f'kundizzjoni tajba tas-saħħa u jzommu l-piz tal-ġisem (huwa permess ftit tkabbir). Itma' kuljum matul il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni u tat-test f'livell stabbilit skont l-ispeċi użata, il-kundizzjonijiet tal-esperiment u l-valur kaliriku tal-ikel (pereżempju għal trota qawsalla, bejn madwar 1 sa 2 % tal-piz tal-ġisem kuljum). Ir-rata tal-għalf għandha tingħazel b'tali mod li jiġu evitati tkabbir veloċi u zieda kbira fil-kontenut lipidu. Sabiex tinżamm l-istess rata tal-għalf, l-ammont tal-għalf għandu jerġa' jiġi kkalkolat kif xieraq, pereżempju darba fil-ġimgħa. Għal dan il-kalkolu, il-piz tal-hut f'kull kompartment tat-test jista' jkun smat mill-piz tal-hut li ddahhal l-aħħar fil-kampjun f'dak il-kompartiment. Tiżinx il-hut li jifdal fil-kompartiment.

Ikul mhux mittiekel u r-rawt għandhom jingibdu kuljum mill-kompartimenti tat-test ftit wara t-tagħlif (30 minuta sa siegħa wara). Il-kompartimenti għandhom jinżammu fl-iktar stat nadif possibbli matul it-test sabiex il-koncentrazzjoni ta' materja organika tibqa' baxxa kemm jista' jkun (ara l-paragrafu 29), peress li l-preżenza ta' karbonju organiku tista' tillimita l-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test (12).

Peress li hafna għalf jiġi minn hut mithun, għandu jiġi żgurat li l-għalf mhuwiex sejjer jinfluwenza r-riżultati tat-test jew jinduċi effetti avversi, eż. billi jkun fih (traċċi ta') pesticidi, metalli tqal u/jew is-sustanza tat-test innifisha.

Dawl u temperatura

Huwa rakkomandat fotoperjodu ta' 12 sa 16-il siegħa u t-temperatura ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) għandha tkun adattata għall-ispeċi tat-test (ara l-Appendiċi 3). It-tip u l-karatteristiċi tad-dawl għandhom ikunu magħrufin. Għandha tingħata attenzjoni għall-fototrasformazzjoni possibbli tas-sustanza tat-test fil-kundizzjonijiet ta' irradjazzjoni tal-istudju. Għandu jintuża dawl xieraq sabiex jiġi evitat esponiment tal-hut għal fotoprodotti mhux naturali. F'xi każijiet jista' jkun xieraq li jintuża filtru sabiex ma tidholx irradjazzjoni tal-UV ta' inqas minn 290 nm.

▼ M7

Konċentrazzjonijiet tat-test

Originarjament it-test tfassal għal sustanzi organiċi mhux polari. Għal dan it-tip ta' sustanza, l-esponiment tal-hut għal konċentrazzjoni waħda huwa mistennij li jkun biżżejjed, peress li ma huwa mistenni ebda effett tal-konċentrazzjoni, għad li jista' jkun hemm bżonn ta' żewġ konċentrazzjonijiet għall-qafas regolatorju rilevanti. Jekk jiġu ttestjati sustanzi barra dan id-dominju, jew ikunu magħrufin indikazzjonijiet oħrajn ta' dipendenza mill-konċentrazzjoni possibbli, it-test għandu jsir b'żewġ konċentrazzjonijiet jew iktar. Jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni waħda biss, għandha tinghata ġustifikazzjoni għall-użu ta' konċentrazzjoni waħda (ara l-paragrafu 79). Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni ttestjata għandha tkun l-inqas konċentrazzjoni possibbli fl-ivell prattiku u tekniku (jiġifieri mhux qrib il-limitu tas-solubilità).

F'ċerti każijiet jista' jkun antiċipat li l-bijokonċentrazzjoni ta' sustanza tiddependi mill-konċentrazzjoni tal-ilma (eż. għall-metalli, meta t-tehid tas-sustanza mill-hut jista' jkun irregolat tal-inqas b'mod parzjali). F'dan il-każ, hemm bżonn li jiġu ttestjati tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet, iżda idealment iktar (ara l-paragrafu 49), li jkunu ambjentalment rilevanti. Anki għal sustanzi li fihom il-konċentrazzjonijiet ittestjati jridu jkunu qrib il-limitu tas-solubilità għal raġunijiet prattiċi, huwa rakkomandat li tal-inqas jiġu ttestjati żewġ konċentrazzjonijiet, għaliex dan jista' jagħti idea ta' kemm huma affidabbli l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment. L-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test għandha tinkorpora l-konċentrazzjoni ambjentalment realistika kif ukoll il-konċentrazzjoni li hija rilevanti għall-fini tal-valutazzjoni speċifika.

Il-konċentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test għandha tingħażel bħala waħda inqas mil-livell tal-effett kroniku tagħha jew 1 % mil-LC₅₀ asintomatika akuta tagħha fi hdan medda ambjentalment rilevanti u tal-inqas ordni ta' kobor ikbar mil-limitu ta' kwantifikazzjoni tagħha fl-ilma bil-metodu analitiku użat. L-ikbar konċentrazzjoni tat-test permissibbli tista' tiġi stabbilita wkoll bid-diviżjoni tal-LC₅₀ akuta ta' 96 siegħa bi proporzjon akut/ kroniku xieraq (eż. proporzjonijiet xierqa għal ċerti sustanzi huma madwar tlieta, iżda whud huma ikbar minn 100). Jekk tintuża t-tieni konċentrazzjoni, din għandha tvarja minn dik ta' hawn fuq b'fattur ta' għaxra. Jekk dan mhuwiex possibbli għaliex il-kriterju tat-tossicità (li jillimita l-konċentrazzjoni tat-test superjuri) u l-limitu analitiku (li jillimita l-konċentrazzjoni tat-test inferjuri), jista' jintuża fattur ta' inqas minn għaxra u għandu jiġi kkunsidrat l-użu ta' sustanza tat-test radjotikkettata (tal-ogħla prijorità, eż. idealment > 98 %). Għandha tinghata attenzjoni sabiex ma tintuża ebda konċentrazzjoni li tkun oghla mil-limitu tas-solubilità tas-sustanza tat-test fil-medja tat-test.

Kontrolli

Kontroll tal-ilma ta' dilwizzjoni wiehed jew, jekk rilevanti (ara l-paragrafi 30 u 31), kontroll wiehed li fih is-solvent għandu jsir ukoll minbarra s-sensiela ta' testijiet.

Il-Frekwenza tal-Kejliet tal-Kwalità tal-Ilma

Matul it-test, l-ossigenu dissolt, it-TOC, il-pH u t-temperatura għandhom jitkejlu fir-riċipienti kollha tat-test u tal-kontroll. L-ebusija u s-salinità totali (jekk rilevanti) għandhom jitkejlu fil-kontroll(i) u f'reċipient wiehed. Jekk jiġu ttestjati żewġ konċentrazzjonijiet jew iktar, kejjel dawn il-parametri fil-konċentrazzjoni għolja (jew fl-ogħla waħda). Bħala minimu, l-ossigenu dissolt u s-salinità (jekk rilevanti) għandhom jitkejlu tliet darbiet — fil-bidu, madwar in-nofs u fl-aħhar tal-perjodu tal-perjodu ta' tehid — u darba fil-gimgha fil-perjodu ta' tisfija. It-TOC għandu jitkejjel fil-bidu tat-test (24 siegħa u 48 siegħa qabel il-bidu tat-test tal-fażi ta' tehid) qabel jiddaħhal il-hut u mill-inqas darba fil-gimgha, kemm matul il-fażi ta' tehid kif ukoll dik ta' tisfija. It-temperatura għandha titkejjel u tiġi rreġistrata kuljum, il-pH fil-bidu u fl-aħhar ta' kull perjodu u l-ebusija darba f'kull test. Idealment, it-temperatura tiġi ssorveljata kontinwament mill-inqas f'reċipient wiehed.

▼ **M7****Kampjunar u Analizi tal-Hut u l-Ilma***Skeda tal-kampjunar tal-hut u l-ilma*

L-ilma għandu jiġi kampjunat mill-kompartimenti tat-test għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test qabel ma jiddaħhal il-hut u matul kemm il-fażi ta' tehid kif ukoll ta' tisfija. L-ilma għandu jiġi kampjunat qabel l-ghalf, fl-istess hin bhall-kampjunar tal-hut. Jista' jkun siewi li l-kampjunar isir iktar spiss sabiex jiġu żgurati konċentrazzjonijiet stabbli wara l-introduzzjoni tal-hut. Matul il-fażi ta' tehid, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test għandhom jiġu stabbiliti sabiex tiġi verifikata l-konformità mal-kriterji ta' validità (paragrafu 24). Jekk l-analizijiet tal-kampjun tal-ilma fil-bidu tal-fażi ta' tisfija juru li s-sustanza tat-test mhijiex identifikata, dan jista' jintuża bħala ġustifikazzjoni sabiex ma jitkejjilx l-ilma tat-test u tal-kontrolli għas-sustanza tat-test għall-bqija tal-fażi ta' tisfija.

Il-hut għandu jiġi kampjunat tal-inqas hames darbiet matul il-fażi ta' tehid u tal-inqas erba' darbiet matul il-fażi ta' tisfija għas-sustanza tat-test. Peress li xi drabi sejjer ikun diffiċli li tiġi kkalkolata stima preċiża raġonevoli tal-valur tal-BCF fuq il-bażi ta' dan in-numru ta' kampjuni (speċjalment meta tkun indikata kinetika li mhijiex dik ta' tehid u tisfija sempliċi tal-ewwel ordni), jista' jkun rakkomandat li l-kampjuni jittiehdu iktar spiss fiż-żewġ perjodi (ara l-Appendiċi 4).

Il-kontenut lipidu għandu jiġi determinat fuq l-istess materjal bijoloġiku li jintuża sabiex tiġi determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tal-inqas fil-bidu u fi tmiem il-fażi ta' tehid u fi tmiem il-fażi ta' tisfija. Jekk dan ma jkunx fattibbli, għandu jittiehdu kampjuni ta' tal-inqas tliet hutiet indipendenti sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu tal-istess tliet punti ta' żmien. In-numru ta' hut għal kull tank fil-bidu tal-esperiment għandu jiġi aġġustat kif xieraq ⁽¹⁾. Inkella, jekk ma jinstab ebda ammont sinifikanti tas-sustanza tat-test fil-hut tal-kontroll (jiġifieri hut mill-popolazzjoni tal-istokk), il-hut tal-kontroll mit-test jista' jiġi analizzat għal kontenut lipidu biss u l-analizi tas-sustanza tat-test fil-grupp(i) tat-test (u l-kostant tar-rata ta' tehid relatata, il-kostant tar-rata ta' tisfija u l-valuri tal-BCF) tista' tiġi kkoreġuta għal bidliet skont il-kontenut lipidu tal-grupp tal-kontroll matul it-test ⁽²⁾.

Hut mejjiet jew marid ma għandux jiġi analizzat għas-sustanza tat-test jew il-konċentrazzjoni lipida.

Eżempju ta' skeda aċċettabbli tal-kontrolli jingħata fl-Appendiċi 4. Skedi oħrajn jistgħu jiġu kkalkolati minnufih bl-użu ta' valuri supponuti oħrajn ta' K_{OW} sabiex jiġi kkalkolat il-hin tal-esponiment għal tehid ta' 95 % (irreferi għall-Appendiċi 5 għall-kalkoli).

Il-kampjunar għandu jtkompla matul il-fażi ta' tehid sakemm ikun ġie stabbilit stat stazzjonarju (ara l-Appendiċi 1, definizzjonijiet u unitajiet) jew il-fażi ta' tehid tiġi terminata b'mod ieħor (wara 28 jew 60 jum, ara l-paragrafi 37 u 38). Qabel ma tibda l-fażi ta' tisfija, il-hut għandu jiġi ttrasferit f'preċipjenti nodfa.

Kampjunar u thejija tal-kampjun

Il-kampjuni tal-ilma għandhom jinkisbu għall-analizi eż. b'sifun minn ġot-tubi inerti minn punt ċentrali fil-kompartiment tat-test. La l-filtrazzjoni u lanqas iċ-ċentrifugazzjoni ma jidhru li dejjem jisseparaw il-frazzjoni mhux bijodisponibbli tas-sustanza tat-test minn dik li hija bijodisponibbli. Jekk tiġi applikata teknika ta' separazzjoni, dejjem għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni għal, jew validazzjoni tat-teknika ta' separazzjoni fir-rapport tat-test minhabba d-diffikultajiet tal-bijodisponibilità (25). B'mod partikolari għal sustanzi ferm idrofobiċi (jiġifieri dawk is-sustanzi b'log $K_{OW} > 5$) (12) (26), fejn jista' jsehh l-adsorbiment għall-matriċi tal-filtru jew il-kontenituri ta' ċentrifugazzjoni, il-kampjuni ma

⁽¹⁾ Jekk il-kontenut lipidu ma jiġix analizzat fl-istess hut bhas-sustanza tat-test, il-hut għandu tal-inqas ikun tal-istess piż u (jekk rilevanti) tal-istess sess.

⁽²⁾ Din l-alternattiva hija valida biss jekk il-hut fil-gruppi tat-test kollha jinzammu f'daqsijiet tal-grupp simili, il-hut jitneħħa bl-istess mod u jintema' bl-istess mod. Dan jiżgura li t-tkabbir tal-hut fil-gruppi kollha tat-test ikun simili, jekk il-konċentrazzjoni ttestjata tkun taht il-medda tossika. Jekk it-tkabbir ikun simili, anki l-kontenut lipidu jkun mistenni li jibqa' simili. Tkabbir differenti fil-kontroll jindika effett tas-sustanza u jinvalida l-istudju.

▼ **M7**

għandhomx ikunu soġġetti għal dawk it-trattamenti. Minflok, għandhom jittiehdu miżuri sabiex it-tankijiet jinżammu nodfa kemm jista' jkun (ara l-paragrafu 46) u l-kontenut tal-karbonju organiku totali għandu jiġi ssorveljat kemm matul il-fażi ta' tehid kif ukoll ta' tisfija (ara l-paragrafu 53). Sabiex jiġu evitati intoppi possibbli b'inqas bijodisponibilità, jista' jintuża l-kampjunar b'tekniki ta' mikroes-trazzjoni tal-fażi solida għal sustanzi fit li xejn solubbli u ferm idrofobiċi.

Il-hut fil-kampjun għandu jiġi ewtanizzati minnufih, bl-użu tal-iktar metodu xieraq u umanitarju (għal kejl tal-hut shih, ebda proċess iehor apparati t-tlahliħ bl-ilma (ara l-paragrafu 28) u l-hut għandu jitnixxef bit-taptip). Iżen u kejjel it-tul totali ⁽¹⁾. F'kull ħuta individwali, il-piż u t-tul imkejlin għandhom ikunu marbutin mal-konċentrazzjoni tas-sustanza analizzata (u l-kontenut lipidu, jekk applikabbli), pereżempju bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull ħuta kampjunata.

Huwa preferibbli li jiġu analizzati l-hut u l-ilma immedjatament wara l-kampjunar sabiex tkun evitata degradazzjoni jew aktar telf u sabiex jiġu kkalkolati l-kostanti approssimativi ta' tehid u r-rata ta' tisfija filwaqt li jitkompla t-test. Analizi minnufih tevita wkoll dewmien fl-istabbiliment ta' jekk intlaħaqx plateau (stat stazzjonarju).

Jekk ma ssirx analiżi immedjata, il-kampjuni għandhom jinħażnu b'metodu xieraq. Qabel ma jibda l-istudju, għandha tinkiseb informazzjoni dwar il-metodu xieraq ta' ħzin għas-sustanza tat-test partikolari — pereżempju, iffrizar profond, zamma f'4 °C, estrazzjoni, eċċ. Id-durata tal-ħzin għandha tingħażel sabiex jiġi żgurat li s-sustanza ma ddegradatx matul il-ħzin.

Kwalità tal-metodu analitiku

Peress li l-proċedura shiħa hija rregolata essenzjalment mir-reqqa, il-preċiżjoni u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza tat-test, iivverifika b'mod esperimentali li r-reqqa, il-preċiżjoni u r-riproduċibilità tal-analiżi tas-sustanza, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza tat-test kemm mill-ilma kif ukoll mill-hut huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari. Dan għandu jkun parti mit-testijiet preliminari. Ara wkoll li s-sustanza tat-test mhijiex fl-ilma ta' dilwizzjoni użat. Jekk ikun hemm bżonn, irranga l-valuri tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma u l-ħut miksuba mit-test għall-irkupru u l-valuri ta' sfond tal-kontrolli. Il-kampjuni tal-hut u l-ilma għandhom jiġu mmanigġjati l-hin kollu b'tali mod li jnaqqas kemm jista' jkun il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-adsorbiment bl-apparat tal-kampjunar).

Analiżi tal-kampjuni tal-ħut

Jekk fit-test jintużaw materjali radjotikkettati, huwa possibbli li jiġu analizzati għar-radjotikketta totali (jiġifieri prinċipali u metaboliti) jew il-kampjuni jistghu jtnaddfu sabiex is-sustanza prinċipali tkun tista' tiġi analizzata għaliha. Jekk il-BCF sejjer ikun ibbażat fuq is-sustanza prinċipali, il-metaboliti ewlenin għandhom jiġu kkaratterizzati, tal-inqas fi tmiem il-fażi ta' tehid (ara l-paragrafu 6). Il-metaboliti ewlenin huma dawk li jirrappreżentaw $\geq 10\%$ tar-residwi totali fit-tessuti tal-hut, dawk li jirrappreżentaw $\geq 5\%$ f'żewġ punti tal-kampjunar konsekuttivi, dawk li juru livelli ikbar matul il-fażi ta' tehid, u dawk ta' thassib

⁽¹⁾ Minbarra l-piż, it-tul totali għandu jiġi rreġistrat għaliex il-paragun tal-firxa taz-zieda fit-tul matul it-test huwa indikatur tajjeb ta' jekk sehhx effett avvers.

▼ **M7**

tossikologiku magħruf. Jekk il-BCF għall-hut shiħ f'termini tar-residwi radjotikkettati totali huwa ≥ 500 , jista' jkun siewi — u għal ċerti kategoriji ta' sustanzi bħal pesticidi ferm rakkomandat — li jiġu identifikati u kkwantifikati l-metaboliti ewlenin. Il-kwantifikazzjoni tat-tali metaboliti tista' tkun meħtieġa minn ċerti awtoritajiet regolatorji. Jekk degradati li jirrappreżentaw $\geq 10\%$ tar-residwi radjotikkettati totali fit-tessut tal-hut huma identifikati u kkwantifikati, huwa rakkomandat ukoll li mbagħad jiġu identifikati u kkwantifikati d-degradati fl-ilma tat-test. Jekk dan ma jkunx fattibbli, dan għandu jkun spjegat fir-rapport.

Normalment il-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tkun determinata għal kull huta individwali mwieġna. Jekk dan ma jkunx possibbli, ir-raggruppar tal-kampjuni f'kull okkażjoni tal-kampjunar jista' jsir iżda r-raggruppar ma jirrestringix il-proċeduri statistiċi li jistgħu jiġu applikati għad-dejta, u b'hekk fit-test għandu jkun inkluz numru adegwat ta' hut sabiex jiġi akkomodat ir-raggruppament mixtieq, il-proċedura statistika u s-saħħa statistika. Ir-referenzi (27) u (28) jistgħu jintużaw bħala introduzzjoni għall-proċeduri tar-raggruppar rilevanti.

Il-BCF għandu jkun espress bħala normalizzat għal hut b'kontenut lipidu ta' 5 % (fuq il-bażi tal-piż niedi) minbarra dak derivat direttament mill-istudju (ara l-paragrafu 21), sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament fl-lipidi. Il-kontenut lipidu tal-hut għandu jiġi stabbilit f'kull mument tal-kampjunar, jekk dan ikun possibbli, idealment fl-istess estratt bħal dak prodott għall-analiżi għas-sustanza tat-test, peress li spiss il-lipidi jkollhom jitneħhew mill-estratt qabel ma jkun jista' jiġi analizzat kromatografikament. Madankollu, l-analiżi tas-sustanzi tat-test spiss teħtieġ proċeduri ta' estrazzjoni speċifiċi li jistgħu jikkontradixxu l-metodi ta' ttestjar għad-determinazzjoni lipidu. F'dan il-każ (sakemm ikun hemm metodi strumentali xierqa u mhux qerrieda disponibbli), huwa rakkomandat li tithaddem strateġija differenti sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu tal-hut (ara l-paragrafu 56). Għandhom jintużaw metodi xierqa sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu (20). It-teknika ta' estrazzjoni tal-kloroform/metanol (29) tista' tkun rakkomandata bħala metodu standard (30), iżda l-metodu Smedes (31) huwa rakkomandat bħala teknika alternattiva. Dan il-metodu msemmi l-aħhar huwa kkaratterizzat minn effiċjenza komparabbli ta' estrazzjoni, preċiżjoni għolja, l-użu ta' solventi organiċi inqas tossiċi u faċilità tat-twettiq. Jistgħu jintużaw metodi oħrajn li għandhom preċiżjoni aħjar mill-metodi rakkomandati jekk ikunu ġġustifikati kif xieraq. Huwa importanti li jingħataw id-dettalji dwar il-metodu użat.

Kejl tat-tkabbir tal-hut

Fil-bidu tat-test, hames sa għaxar hutiet mill-popolazzjoni tal-istokk iridu jintiżnu b'mod individwali u jitkejjel it-tul totali tagħhom. Dawn jistgħu jkunu l-istess hutiet użati għall-analiżi lipidu (ara l-paragrafu 56). Il-piż u t-tul tal-hut użat għal kull kampjun meħud kemm mill-grupp tat-test kif ukoll tal-kontroll għandhom jitkejlu qabel ma ssir l-analiżi kimika jew lipidu. Il-kejl tal-hut fil-kampjun jistgħu jintużaw sabiex jiġu stmati l-piż u t-tul tal-hut li jifdal fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll (ara l-paragrafu 45).

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

Il-kurva tat-teħid tas-sustanza tat-test għandha tinkiseb bl-ipplottjar tal-koncentrazzjoni tagħha fil-hut jew fuq (jew tessuti speċifiċi) fil-fażi ta' teħid kontra l-hin fuq skali aritmetiċi. Jekk il-kurva laħqet plateau, jiġifieri, issir dejjem iktar asintomatika għall-assi tal-hin, il-BCF fi stat stazzjonarju (BCF_{ss}) għandu jiġi kkalkolat minn:

$$\frac{C_f \text{ at steady state}(\text{mean})}{C_w \text{ at steady state}(\text{mean})}$$

▼ M7

L-iżvilupp ta' C_f jista' jkun influwenzat mit-tkabbir tal-hut (ara l-paragrafu 72 u 73). Il-konċentrazzjoni tal-esponiment medja (C_w) hija influwenzata minn varjazzjoni tul iż-żmien. Jista' jkun mistenni li konċentrazzjoni medja ponderata għall-hin tkun iktar rilevanti u preċiża għal studji tal-bijoakkumulazzjoni, anki jekk il-varjazzjoni tkun fi hdan il-medda ta' validità xierqa (ara l-paragrafu 24). Konċentrazzjoni tal-ilma medja ponderata għall-hin (TWA) tista' tiġi kkalkolata skont l-Appendiċi 5, sezzjoni 1.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) għandu jiġi stabbilit bħala l-proporzjon k_1/k_2 , iż-żewġ kostanti tar-rata kinetika tal-ewwel ordni. Il-kostanti tar-rata k_1 u k_2 u BCF_K jistgħu jiġu derivati bl-iffittjar fl-istess hin tal-fażi ta' tehid kif ukoll dik ta' tisfija. Inkella, k_1 u k_2 jistgħu jiġu stabbiliti b'mod sekwenzjali (ara l-Appendiċi 5 għal deskrizzjoni u paragun ta' dawn il-metodi). Il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2) jista' jkun jehtieg li jiġi kkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir (ara l-paragrafu 72 u 73). Jekk ikun ovvju li l-kurva tat-tehid u/jew it-tisfija mhijiex l-ewwel ordni, għandhom jintużaw mudelli iktar kumplessi (ara r-referenzi fl-Appendiċi 5) u għandu jittfittex parir minghand esperti tal-bijostatistika u/jew tal-farmakokinetika.

Dejta dwar il-piż/it-tul tal-hut

Il-piżijiet niedja u t-tul totali tal-hut individwali għall-intervalli tal-kampjunar kollha jitqiegħdu f'tabella b'mod separat għall-gruppi tat-test u tal-kontroll matul il-fażijiet ta' tehid (inkluża l-popolazzjoni tal-istokk għall-bidu tat-tehid) u ta' tisfija. F'kull ħuta individwali, il-piż u t-tul imkejlin għandhom ikunu marbutin mal-konċentrazzjoni kimika analizzata, pereżempju bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull ħuta kampjunata. Il-piż huwa l-kejl ippreferut tat-tkabbir għall-fini ta' korrezzjoni tal-valuri tal- BCF kinetiku għad-dilwizzjoni tat-tkabbir (ara l-paragrafu 73 u l-Appendiċi 5 għall-metodu użat għall-korrezzjoni tad-dejta għad-dilwizzjoni tat-tkabbir).

Korrezzjoni tad-Dilwizzjoni tat-Tkabbir u n-Normalizzazzjoni tal-Lipidi

It-tkabbir tal-hut matul il-fażi ta' tisfija jista' jbaxxi l-konċentrazzjonijiet kimiċi mkejlin fil-hut bl-effett li l-kostant totali tar-rata ta' tisfija (k_2) ikun ikbar minn dak li jirriżulta minn proċessi ta' tneħħija (eż. respirazzjoni, metabolizmu, eġestjoni) waħedhom. Il-fatturi ta' bijokonċentrazzjoni kinetika għandhom jiġu kkoreġuti għad-dilwizzjoni tat-tkabbir. BCF_{SS} sejjer ikun influwenzat mit-tkabbir ukoll, iżda ma hemm ebda proċedura miftiehma disponibbli għall-korrezzjoni ta' BCF_{SS} għat-tkabbir. F'każijiet ta' tkabbir sinifikanti, il- BCF_K , ikkoreġut għat-tkabbir (BCF_{K_g}), għandu jinkiseb ukoll peress li jista' jkun kejl iktar rilevanti tal-fattur ta' bijokonċentrazzjoni. Il-kontenuti lipidi tal-hut tat-test (li huma ferm assoċjati mal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi idrofobiċi) jistgħu jvarjaw biżżejjed fil-prattika tant li jkun hemm bżonn normalizzazzjoni għal kontenut lipidu tal-hut stabbilit (5 % w/w) sabiex jiġu ppreżentati l-fatturi tal-bijokonċentrazzjoni kinetika kif ukoll fi stat stazzjonarju b'mod sinifikanti, sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament fl-lipidu (eż. certi sustanzi perfluorinati jistgħu jaqdbu mal-proteini). L-ekwazzjonijiet u l-eżempji għal dawn il-kalkoli jistgħu jinkisbu fl-Appendiċi 5.

Sabiex jiġi kkoreġut BCF kinetiku għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, il-kostant tar-rata ta' tisfija għandu jiġi kkoreġut għat-tkabbir. Dan il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2_g}) huwa kkalkolat billi l-kostant tar-rata ta' tkabbir (k_g , kif miksub mid-dejta dwar il-piż imkejjel) jitnaqqas mill-kostant tar-rata ta' tisfija totali (k_2). Imbagħad jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika kkoreġut għat-tkabbir billi l-kostant tar-rata ta' tehid (k_1) jiġi diviż bil-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2_g}) (ara l-Appendiċi 5). F'certi każijiet dan l-approċċ ikun friskju. Pereżempju, għal sustanzi li jissaffew bil-mod hafna

▼ M7

ttestjati f'hut li jikber malajr, il- k_{2g} derivat jista' jkun żgħir hafna u b'hekk l-iżball fiż-żewġ kostanti tar-rati użati sabiex jinkiseb isir kritiku, u f'ċerti każijiet l-istimi tal-kg jistgħu jkunu ikbar mill- k_2 . Approċċ alternattiv li jevita l-htieġa ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir jinvolve l-użu ta' dejta dwar it-tisfija tal-massa tas-sustanza tat-test għal kull huta (fuq il-bażi tal-huta shiħa) minflok id-dejta tas-soltu dwar il-massa tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-massa tal-hut (konċentrazzjoni). Dan jista' jinkiseb faċilment peress li t-testijiet skont dan il-metodu ta' ttestjat għandhom jorbtu l-konċentrazzjonijiet tat-tessut irreġistrati mal-piżijiet tal-hut individwali. Il-proċedura sempliċi għal dan hija spjegata fl-Appendiċi 5. Kun af li l- k_2 xorta waħda għandu jiġi smat u rrapportat, anki jekk jintuza dan l-approċċ.

Il-fatturi tal-bijokonċentrazzjoni kinetika u fi stat stazzjonarju għandhom jiġu rrapportati wkoll b'rabta mal-kontenut lipidu tal-hut prestabbilit ta' 5 % (w/w), sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament fl-lipidu. Id-dejta dwar il-konċentrazzjoni tal-hut, jew il-BCF, huma normalizzati skont il-proporzjon bejn 5 % u l-kontenut lipidu medju (individwali) attwali (f' % piż niedi) (ara l-Appendiċi 5).

Jekk l-analizijiet kimiċi u lipidi saru fuq l-istess hut, id-dejta normalizzata għal-lipidu tal-hut individwali għandha tintuża sabiex jiġi kkalkolat BCF normalizzat għal-lipidu. Inkella, jekk it-tkabbir fil-hut tal-kontroll u l-hut espost ikun simili, jista' jintuża l-kontenut lipidu tal-hut tal-kontroll waħdu għall-korrezzjoni għal-lipidu (ara l-paragrafu 56). Metodu għall-kalkolu ta' BCF normalizzat għal-lipidu huwa deskritt fl-Appendiċi 5.

Interpretazzjoni tar-riżultati

Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'kawtela meta l-konċentrazzjonijiet imkejljin tas-soluzzjonijiet tat-test isehħu fl-ivell qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku.

Fil-prinċipju, it-tkabbir medju fil-grupp tat-test kif ukoll f'tal-kontroll ma għandux ikun wisq differenti sabiex jiġu esklużi l-effetti tossiċi. Il-kostanti tar-rata ta' tkabbir jew il-kurvi tat-tkabbir taż-żewġ gruppi għandhom jitqabblu permezz ta' proċedura xierqa⁽¹⁾.

Kurvi tat-tehid u t-tisfija definiti ċari huma indikazzjoni ta' dejta dwar il-bijokonċentrazzjoni ta' kwalità tajba. Għall-kostanti tar-rati, ir-riżultat ta' test χ^2 ta' kemm joqgħod tajjeb għandu juri li joqgħod tajjeb (jiġifieri perċentwal żgħir ta' żball fil-kejl (32)) għall-mudell ta' bjoakkumulazzjoni, sabiex il-kostanti tar-rati jkunu jistgħu jitqiesu affidabbli (ara l-Appendiċi 5). Jekk tintuża iktar minn konċentrazzjoni tat-test waħda, il-varjazzjoni fil-kostanti ta' tehid/tisfija bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test għandha tkun inqas minn 20 %⁽²⁾. Jekk le, tista' tiġi indikata d-dipendenza fuq il-konċentrazzjoni. Għandhom ikunu rreġistrati d-differenzi sinifikanti osservati fir-rati ta' tehid/tisfija bejn il-konċentrazzjonijiet applikati tat-test u jingħataw l-ispejgazzjonijiet possibbli. Ġeneralment, il-limitu ta' kunfidenza ta' 95 % tal-BCFs minn studju ddisinjati kif xieraq joqrob lejn ± 20 % tal-BCF derivat.

Jekk jiġu ttestjati żewġ konċentrazzjonijiet jew iktar, ir-riżultati taż-żewġ konċentrazzjonijiet jew kollha kemm huma jintużaw sabiex jiġi eżaminat jekk ir-riżultati

⁽¹⁾ Jista' jsir test- t fuq il-kostanti tar-rata ta' tkabbir, sabiex jiġi ttestjat dwar jekk it-tkabbir ivarjax bejn il-grupp tal-kontroll u dak tat-test, jew test- F fil-każ ta' analiżi tal-varjanza. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jintuża test tal-proporzjon ta' probabilità jew test- F sabiex jgħin fl-għażla tal-mudell tat-tkabbir xieraq (monograff 54 tal-OECD, (32)).

⁽²⁾ Dawn il-perċentwali jassumu li l-metodi analitiċi huma affidabbli u li n-nofs hajja hija ta' < 14-il jum. Jekk il-metodi analitiċi jkunu inqas affidabbli jew in-nofs hajja tiżdied (hafna), dawn in-numru jsiru ikbar.

▼ **M7**

humieix konsistenti u sabieix jintwera jekk hemmx dipendenza fuq il-konċentrazzjoni. Jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni waħda biss sabieix jitnaqqas l-użu ta' annimali u/jew riżorsi, għandha tingħata ġustifikazzjoni għall-użu ta' konċentrazzjoni waħda.

Il- BCF_{SS} li jirriżulta jkun dubjuż jekk il- BCF_K ikun ferm ikbar mill- BCF_{SS} , peress li dan jista' jkun indikazzjoni li l-istat stazzjonarju ma ntlahaqx jew li d-dilwizzjoni tat-tkabbir u l-proċessi tat-telf ma ġewx ikkunsidrati. F'każijiet li fihom il- BCF_{SS} ikun ferm oghla mill- BCF_K , id-derivazzjoni tal-kostanti tar-rata ta' teħid u ta' tisfija għandha tiġi vverifikata għal żbalji u terġa' tiġi evalwata. Proċedura ta' ffitjar differenti tista' ttejjeb l-istima tal- BCF_K (ara l-Appendiċi 5).

Rapport tat-test

Apparti l-informazzjoni dwar is-sustanza tat-test indikata fil-paragrafu 3, ir-rapport tat-test jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

L-ghamla fizika u, fejn rilevanti, il-proprietajiet fiżjokimiċi;

— Dejta dwar l-identifikazzjoni kimika, bhall-isem IUPAC jew CAS, in-numru CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità kimika tal-impuritatiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ. (inkluż il-kontenut ta' karbonju organiku, jekk xieraq).

— Għal sustanzi multikostitwenti u UVCB (sustanzi kimiċi b'kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti ta' reazzjoni kumplessa u Materjali bijoloġiċi) deskrizzjoni, safejn possibbli, tal-identità kimika tal-kostitwenti individwali u, għal kull wieħed, tal-perċentwal tiegħu mill-massa totali tas-sustanza. Għandu jiġi spjegat fil-qosor kif il-metodu analitiku użat fit-test jirrifletti kejl tal-konċentrazzjoni tas-sustanza; il-proċeduri analitiċi kollha għandhom jiġu deskritti, inklużi l-preċiżjoni tal-metodu, il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu, u l-limitu ta' kwantifikazzjoni.

— Jekk radjotikkettati, il-pożizzjoni preċiża tal-atomu/i tikkettati u l-perċentwal tar-radjuattività assoċjata mal-impuritatiet.

— Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għall-hut (idealment l-ispeċi tat-test). It-tossiċità għandha tiġi rrapportata bħala LC_{50} akuta fuq 96 siegħa u NOAEC & LOAEC minn studju kroniku (jiġifieri test fi stadju bikri tal-hajja jew test taċ-ċiklu shiħ tal-hajja, jekk disponibbli).

— Il-kundizzjonijiet tal-ħzin tas-sustanza kimika tat-test jew is-sustanza tat-test u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test jew is-sustanza tat-test fil-kundizzjonijiet tal-ħzin jekk kienet maħżuna qabel ma ntuzat.

Speċijiet tat-test:

L-isem xjentifiku, ir-razza, is-sors, kwalunkwe pretrattament, l-akklimatizzazzjoni, l-eż, is-sess (jekk rilevanti), il-medda tad-daqs (piż u tul), eċċ.

Kundizzjonijiet tat-test:

— Il-proċedura tat-test użata (eż. bi fluss kontinwu jew semistatika); studju regolari jew disinn minimizzat (inklużi raġuni u ġustifikazzjoni).

— It-tip u l-karatteristiċi tal-illuminazzjoni użata u l-fotoperjodu/i.

— Id-disinn tat-test (eż. in-numru u l-kobor tal-kompartimenti tat-test, ir-rata tal-bdil tal-volum tal-ilma, ir-rata ta' tagħbija, in-numru tar-repliki, in-numru tal-hut għal kull replika, in-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-fażijiet ta' teħid u tisfija, il-frekwenza tal-kampjunar għall-kampjuni tal-hut u tal-ilma),

▼ **M7**

- Metodu tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna u l-frekwenza tar-rinnovar (is-solvent, il-konċentrazzjoni tiegħu u l-kontribuzzjoni tiegħu għall-kontenut ta' karbonju organiku tal-ilma tat-test għandhom jingħataw, meta jintużaw) jew deskrizzjoni tas-sistema ta' dożaġġ alternattiva.
- Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-mezzi tal-valuri mkejl u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li nkisbu bih.
- Is-sors tal-ilma ta' dilwizzjoni, deskrizzjoni ta' kwalunkwe pretrattament, ir-riżultati ta' kwalunkwe wiri tal-hila tal-ħut tat-test li jgħix fl-ilma, u l-karatteristiċi tal-ilma: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt, il-livelli ta' kloru residwu (jekk imkejla), il-karbonju organiku totali, is-solidi sospiżi, is-salinità tal-medium tat-test (jekk xieraq) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir.
- Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, l-ebusija, it-TOC, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt; il-metodi użati u l-frekwenza tal-kejl.
- Informazzjoni ddettaljata fuq l-ghalf, eż. it-tip ta' ikel, is-sors, il-komposizzjoni (tal-inqas tal-kontenut lipidu u tal-proteini jekk possibbli), ir-rata tal-ghalf magħżula, l-ammont mogħti u l-frekwenza;
- Informazzjoni fuq it-trattament tal-kampjuni tal-ħut u tal-ilma, inklużi d-dettalji dwar il-preparazzjoni, il-ħżin, l-estrazzjoni u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sostanza tat-test u l-kontenut lipidu.
- Il-metodi użati għall-każwalizzazzjoni tat-trattament u l-assenjament tal-ħut għar-reċipjent tat-test.
- Id-data tat-tidħil tal-organizmi tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test u d-durata tat-test.
- Deskrizzjoni tat-testijiet tas-sejbien tal-medda u r-riżultati, jekk disponibbli.

Ir-riżultati:

- Ir-riżultati minn kwalunkwe studju preliminari li sar.
- Il-mortalità tal-ħut tal-kontroll u l-ħut f'kull kompartiment tal-esponiment u kwalunkwe mġiba anormali osservata.
- Informazzjoni dwar kwalunkwe effett avvers osservat.
- Deskrizzjoni shiħa tal-proċeduri ta' analiżi kimika kollha mhaddmin inklużi l-limiti ta' detezzjoni u l-kwantifikazzjoni, il-varjabbiltà u l-irkupru.
- Il-kontenut lipidu tal-ħut, inkluż il-metodu użat u, jekk derivat, il-fattur ta' normalizzazzjoni tal-lipidu (L_n , fattur sabiex jiġu espressi riżultati relattivi għall-kontenut lipidu tal-ħut ta' 5 %).
- Dejta f'tabella tal-piż (u t-tul) tal-ħut, b'rabta mal-konċentrazzjonijiet kimiċi tal-ħut individwali (u l-kontenut lipidu, jekk applikabbli), kemm għall-gruppi tal-kontroll u tal-esponiment (pereżempju bl-użu ta' identifikaturi uniċi għal kull ħuta fil-kampjun) u kalkoli għall-kostant(i) tar-rata ta' tkabbir derivat.

▼ **M7**

- Dejta f'tabella tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut (C_f , marbuta mal-ħut individwali) u l-ilma (C_w) (bil-valuri medji għall-grupp tat-test u l-kontroll, id-devjazzjoni standard u l-medda, jekk xierqa) għall-hinijiet tal-kampjunar kollha (C_f espressa f'mg/kg piż niedi tal-ġisem shiħ jew tessuti speċifikati fih, eż. lipid, u C_w f'mg/l). Valuri tas- C_w għas-serje tal-kontroll (l-isfond għandu jiġi rrapportat ukoll).
- Il-kurvi (inkluża d-dejta mkejla kollha), li juru dan li ġej (jekk applikabbli, il-konċentrazzjonijiet jistgħu jiġu espressi b'rabta mal-ġisem shiħ u l-kontenut lipidu normalizzat għal 5 % tal-annimal jew tessuti speċifiċi tiegħu):
 - it-tkabbir, jiġifieri l-piż tal-ħut vs il-ħin jew il-piż trasformat tal-logaritma naturali vs il-ħin (inkluż il-kostant tar-rata ta' tkabbir derivata, k_g);
 - it-tehid u t-tisfija tas-sustanza tat-test fil-ħut (fi graff wieħed);
 - il-ħin għall-istat stazzjonarju (jekk jinkiseb);
 - il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali vs il-ħin tat-tehid (inkluż il-kostant tar-rata ta' tehid derivat k_1);
 - il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali (f'konċentrazzjoni) vs il-ħin tat-tisfija (inkluż il-kostant tar-rata ta' tisfija derivat k_2); u
 - il-kurvi tal-faży ta' tehid kif ukoll ta' tisfija, li juru kemm id-dejta kif ukoll il-mudell iffittjat.
- Jekk spezzjoni viżiva ta' plott turi eċċezzjonijiet ovvj, jista' jiġi applikat test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu sabiex jitnehhew punti ta' dejta spurji kif ukoll tingħata ġustifikazzjoni dokumentata għaliex tnehhew.
- Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{ss}), jekk (kważy) jinkiseb stat stazzjonarju.
- Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) u l-kostanti tar-rata ta' tisfija u tehid derivati k_1 u k_2 , flimkien mal-varjanzi $f k_2$ (pendil u interċetta) jekk jintuża ffittjar sekwenzjali.
- Il-limiti tal-kunfidenza, id-devjazzjoni standard (kif disponibbli) u l-metodi ta' kalkolu/analizi tad-dejta għal kull parametru għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test użata.
- Kwalunkwe informazzjoni li tikkonċerna metaboliti radjotikkettati tas-sustanza tat-test u l-akkumulazzjoni tagħhom.
- Il-kostant(i) tar-rata ta' tkabbir (inkluż l-intervall(i) ta' kunfidenza ta' 95 %) u l-valuri tal-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir ikkal-kolat (k_{2g}), tan-nofs ħajja u tal-BCF (BCF_{Kg}).
- Kwalunkwe haġa li mhijiex tas-soltu dwar it-test, kwalunkwe devjazzjoni minn dawn il-proċeduri, u kwalunkwe informazzjoni rilevanti oħra.
- Tabella li tiġbor id-dejta mkejla u kkalkolata rilevanti, kif spjegat hawn:

▼ **M7**

Il-Kostanti tar-Rata ta' Tehid u Tisfija tas-Sustanza u l-Fatturi ta' Bijokonċentrazzjoni (BCF)	
k_g (kostant tar-rata ta' tkabbir; jum^{-1}):	Dahhal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (kostant totali tar-rata ta' tehid; $\text{l kg}^{-1} \text{jum}^{-1}$):	Dahhal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (kostant totali tar-rata tat-tisfija; jum^{-1}):	Dahhal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
k_{2g} (kostant tar-rata ta' tisfija korrett ghat-tkabbir; jum^{-1}):	Dahhal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
C_f (konċentrazzjoni kimika fil-hut fi stat stazzjoanrju; mg kg^{-1}):	Dahhal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
C_w (konċentrazzjoni kimika fl-ilma; mg l^{-1}):	Dahhal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
L_n (fattur ta' normalizzazzjoni ghal-lipidu):	Dahhal Valur ⁽³⁾
BCF_{SS} (BCF fi stat stazzjoanrju; l kg^{-1}):	Dahhal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
BCF_{SSL} (BCF fi stat stazzjoanrju normalizzat ghal-lipidu; l kg^{-1}):	Dahhal Valur ⁽³⁾ $\pm$ SD ⁽²⁾
BCF_K (BCF kinetiku; l kg^{-1}):	Dahhal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF_{Kg} (BCF kinetiku kkoreġut ghat-tkabbir; l kg^{-1}):	Dahhal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (nofs ħajja kkoreġuta ghat-tkabbir; jum):	Dahhal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF_{KL} (BCF kinetiku normalizzat ghal-lipidu; l kg^{-1}):	Dahhal Valur
BCF_{KL} (BCF kinetiku kkoreġut ghat-tkabbir normalizzat ghal-lipidu; l kg^{-1}):	Dahhal Valur

(¹) CI: intervall ta' kunfidenza (fejn ikun possibbli li jiġi stmat)
(²) SD: Devjazzjoni standard (fejn ikun possibbli li tiġi stmata)

Ir-riżultati rrapportati bħala “mhux identifikati/ikkwalifikati fil-limitu ta' detezzjoni/kwantifikazzjoni” bi żvilupp ta' metodu ta' qabel l-ittestjar u disinn sperimentali għandhom jiġu evitati, peress li dawn ir-riżultati ma jistgħux jintużaw għal kalkoli tal-kostanti tar-rati.

C.13 — II TEST TAL-HUT TAL-ESPONIMENT MILWIEM MINIMIZZAT

INTRODUZZJONI

L-esperjenza dejjem ikbar li nkisbet fit-twettiq u l-interpretazzjoni tat-test shih, kemm mil-laboratorji kif ukoll mill-korpi regolatorji, turi li — bi ftit eċċezzjonijiet — il-kinetika tal-ewwel ordni tapplika għall-istima tal-kostanti tar-rati ta' tehid u tisfija. B'hekk, il-kostanti tar-rata ta' tehid u tisfija jistgħu jiġu stmati b'minimu ta' punti tal-kampjunar, u l-BCF kinetiku derivat.

L-iskop inizjali tal-eżaminazzjoni ta' disinni alternattivi għall-istudji tal-BCF kien li jiġi żviluppat test żgħir li jintuża fi stadju ta' ttestjar intermedju jew li jiġu kkonfermati l-istimi tal-BCF fuq il-bażi tal- K_{ow} u l-QSARs u sabiex tiġi eliminata l-htieġa ta' studju shih għal hafna sustanzi, u sabiex jiġu minimizzati l-kost u l-użu ta' annimali bit-tnaqqis fil-kampjunar u fin-numru ta' sekwenzi analitiċi

▼ M7

mwettqin. Filwaqt li jiġi segwit id-disinn ewlieni tal-metodu ta' ttestjar preċedenti sabiex ikunu jistgħu jiġu integrati r-riżultati tat-test mad-dejta tal-BCF eżistenti, u sabiex jiġihaffu t-tweġġ tal-itestjar u l-interpretazzjoni tad-dejta, l-iskop kien li jiġu pprovduti stimi tal-BCF b'reqqa u preċiżjoni adegwati għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjoni tar-riskju. Hafna mill-istess kunsiderazzjonijiet japplikaw bħal fit-test shiħ, eż. kriterji tal-validità (ara l-paragrafu 24) u l-waqfien ta' test jekk jidher teħid inisinfikanti fi tmiem il-fażi ta' teħid (ara l-paragrafi 16 u 38).

Is-sustanzi li jkunu eliġibbli għad-disinn tat-test minimizzat għandhom jappartjenu għad-dominju ġenerali li għalih ġie żviluppat dan il-metodu ta' ttestjar, jiġifieri sustanzi organiċi mhux polari (ara l-paragrafu 49). Jekk hemm xi indikazzjoni li s-sustanza li sejra tiġi ttestjata tista' turi mgħiba differenti (eż. devjazzjoni ċara mill-kinetika tal-ewwel ordni), għandu jsir test shiħ għal finijiet regolatorji.

Tipikament, it-test minimizzat ma jsirx tul perjodu iqsar mit-test tal-BCF standard, iżda jinvolvi inqas kampjunar tal-hut (ara l-Appendiċi 6 għar-raġuni). Madankollu, il-perjodu ta' tisfija jista' jitqassar għal sustanzi li jissaffew malajr sabiex jiġi evitat milli l-konċentrazzjonijiet fil-hut jaqgħu taħt il-limitu ta' detezzjoni/kwantifikazzjoni qabel ma jintemm it-test. Jista' jintuza test tal-hut b'espoinment minimizzat b'konċentrazzjoni waħda sabiex tiġi stabbilita l-htiega ta' test shiħ, u jekk id-dejta li tirriżulta użata sabiex jiġu kkalkolati l-kostanti tar-rati u l-BCF tkun robusta (ara l-paragrafu 93), it-test shiħ jista' jiġi evitat jekk il-BCF li jirriżulta ma jkun xejn qrib il-valuri regolatorji ta' tħassib.

F'ċerti każijiet, jista' jkun ta' vantaġġ li jsir id-disinn tat-test minimizzat b'iktar minn konċentrazzjoni tat-test waħda bħala test preliminarj sabiex jiġi stabbilit jekk l-istimi tal-BCF għal sustanza humiex dipendenti mill-konċentrazzjoni. Jekk l-istimi tal-BCF mit-test minimizzat juru dipendenza mill-konċentrazzjoni, bilfors ikollu jitwettagħ it-test shiħ. Jekk, fuq il-bażi ta' test minimizzat bħal dan, l-istimi tal-BCF ma jkunux dipendenti mill-konċentrazzjoni iżda r-riżultati ma jitqisux definittivi, kwlunkwe test shiħ sussegwenti jista' jsir b'konċentrazzjoni waħda, u b'hekk jonqos l-użu ta' annimali meta mqabbel ma' test shiħ b'żewġ konċentrazzjonijiet (jew iktar).

Sustanzi potenzjalment eliġibbli għat-test minimizzat:

- Għandu jkollhom probabilità li jesibixxu teħid tal-ewwel ordni approssimattiv u kinetika ta' tisfija, eż. derivati minn read-across b'sustanzi simili;
- Għandu jkollhom $\log K_{OW} < 6$ sakemm ma jkunx mistenni metabolizmu rapidu⁽¹⁾;
- Għandhom ikunu solubbli fl-ilma fir-rigward tat-teknika analitika (ara l-paragrafu 24);
- Għandhom ikunu kwantifikabbli (jiġifieri l-konċentrazzjonijiet għandhom ikunu tal-inqas ordni ta' kobor ikbar mil-limitu ta' kwantifikazzjoni), kemm fil-hut kif ukoll fl-ilma, it-tikkettar radjuattiv huwa rakkomandat (ara l-paragrafu 23); u
- Għandu jkollhom perjodu ta' tisfija ikbar min-nofs haġja prevista tagħhom (ara l-Appendiċi 5 għall-kalkoli), jew id-durata tat-tisfija għandha tiġi aġġustata kif xieraq (ara l-paragrafu 91). Eċċezzjoni għal din ir-regola hija permessa jekk ikun mistenni metabolizmu rapidu tas-sustanza.

⁽¹⁾ Fil-fatt it-test minimizzat jista' jintuza sabiex jintwera metabolizmu rapidu meta jkun magħruf li hemm probabilità ta' metabolizmu rapidu.

▼ **M7****SKEDA TAL-KAMPJUNAR GĦAL STUDJI SKONT ID-DISINN MINIMIZZAT****Kampjunar tal-Hut**

Il-kampjunar tal-hut jitnaqqas għal erba' punti tal-kampjunar:

- Fin-nofs u fi tmiem il-fażi ta' teħid (din tal-aħħar li hija l-bidu tat-tisfija wkoll), eż. wara 14 u 28 jum (33).
- F'nofs il-fażi ta' tisfija u fi tmiem l-istudju (meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tkun < 10 % tal-konċentrazzjoni massima, jew tal-inqas biċ-ċar oltre nofs ħajja wahda tas-sustanza), eż. wara 7 u 14-il jum ta' tisfija (33). Jekk tkun mistennija jew osservata tisfija rapida, jista' jkun hemm bżonn li jitqassar il-perjodu ta' tisfija sabiex jiġi evitat milli l-konċentrazzjonijiet fil-hut jaqgħu taht il-limitu ta' kwantifikazzjoni.
- Kejl tal-lipidu bħal fl-istudju shih.
- Korrezzjoni tat-tkabbir bħal fl-istudju shih.
- Il-BCF huwa kkalkolat bħala BCF kinetiku.

Kampjunar tal-ilma

Għad-disinn minimizzat, l-ilma jiġi kampjunat bħal fl-istudju shih (ara l-para-grafu 54) jew tal-inqas hames darbiet maqsumin bl-eżatt matul il-fażi ta' teħid, u kull ġimgħa fil-fażi ta' tisfija.

Modifiki fid-disinn

Fid-dawl tal-proprjetajiet tas-sustanza tat-test, previzjonijiet validi tal-QSAR u l-iskop speċifiku tal-istudju, jistgħu jiġu kkunsidrati ċerti modifiki fid-disinn tal-istudju:

- Jekk ikun hemm bżonn ta' perċezzjoni ikbar, jista' jintuza iktar hut (6 jew 8 minflok 4) għall-kampjun fi tmiem il-fażi ta' teħid.
- L-inkluzjoni ta' grupp “zejjed” ta' hut li sejjer jintuza jekk it-tisfija wara 14-il jum (jew it-tmiem imbassar tal-fażi ta' tisfija) ma tkunx biżżejjed għal tisfija adegwata (jiġifieri > 50 %). Jekk id-durata mbassra tal-fażi ta' tisfija tkun iqsar jew itwal minn 14-il jum, l-iskeda ta' kampjunar għandha tiġi adattata (jiġifieri grupp tal-hut wiehed fit-tmiem imbassar tal-fażi ta' tisfija, u grupp wiehed wara nofs dak iż-żmien).
- L-użu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test sabiex tiġi esplorata d-dipendenza possibbli mill-konċentrazzjoni. Jekk ir-riżultati tat-test minimizzat, imwettaq b'żewġ konċentrazzjonijiet tat-test, juru li l-BCF mhuwiex dipendenti mill-konċentrazzjoni (jiġifieri jvarja inqas minn 20 %), konċentrazzjoni tat-test wahda tista' tiġi kkunsidrata biżżejjed f'test shih, jekk isir.
- Jidher probabbli li l-mudelli tal-proċessi ta' bjoakkumulazzjoni bħal dawki proposti minn Arnot *et al.* (35) jistgħu jintużaw sabiex jgħinu fl-ippjanar tat-tal-fażijiet ta' teħid u tisfija (ara wkoll l-Appendiċi 5).

Kalkoli

Ir-raġuni wara dan l-approċċ hija li l-fattur ta' bjoakkonċentrazzjoni f'test shih jista' jew jiġi stabbilit bħala fattur ta' bjoakkonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{ss}) billi jiġi kkalkolat il-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tessut tal-hut għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma, jew billi jiġi kkalkolat il-fattur ta' bjoakkonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) bħala l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' teħid k_1 għall-kostant tar-rata ta' tisfija k_2 . Il- BCF_K huwa validu anki jekk

▼ **M7**

ma tintlaħaqx konċentrazzjoni fi stat fiss ta' sustanza matul it-teħid, diment li t-teħid u t-tisfija jaġixxu bejn wieħed u ieħor skont il-proċess tal-kinetika tal-ewwel ordni. Bħala minimu assolut, huma meħtieġa żewġ punti ta' deġta sabiex jiġu stmati l-kostanti tar-rati ta' teħid u tisfija, wieħed fi tmiem il-fażi ta' teħid (jiġifieri fil-bidu tal-fażi ta' tisfija) u wieħed fi tmiem il-fażi ta' tisfija (jew wara parti sinifikanti tagħha). Il-punt ta' kampjunar intermedju huwa rakkomandat bħala verifika fuq il-kinetika tat-teħid u t-tisfija ⁽¹⁾. Għall-kalkoli, ara l-Appendiċijiet 5 u 6.

Interpretazzjoni tar-riżultati

Sabiex jiġu vvalutati l-validità u l-valur informattiv tat-test, ivverifika li l-perjodu ta' tisfija jaqbeż nofs haġja waħda. Barra minn hekk, il- BCF_{Km} (BCF kinetiku derivat minn test minimizzat) għandu jitqabbel mal-valur tal- BCF_{SS} minimizzat (li huwa l- BCF_{SS} ikkalkolat fi tmiem il-fażi ta' teħid, jekk jiġi supponut li ntlahaq stat stazzjonarju. Dan jista' jiġi supponut biss, għaliex in-numru ta' punti ta' kampjunar mhuwiex biżżejjed sabiex tinghata prova ta' dan). Jekk il- $BCF_{Km} < BCF_{SS}$ minimizzat, il- BCF_{SS} minimizzat għandu jkun il-valur ippreferut. Jekk il- BCF_{Km} ikun inqas minn 70 % tal- BCF_{SS} minimizzat, ir-riżultati mhumieħ validi, u għandu jsir test shiħ.

Jekk it-test minimizzat jagħti BCF_{Km} ta' madwar kwalunkwe valur ta' thassib regolatorju, għandu jsir test shiħ. Jekk ir-riżultat ma jkun qrib ebda valur regolatorju ta' thassib (ferm oghla jew inqas), jaf ma jkunx hemm bżonn li jsir test shiħ, jew jista' jsir test shiħ b'konċentrazzjoni waħda jekk dan ikun meħtieġ mill-qafas regolatorju rilevanti.

Jekk jinstab li test shiħ huwa neċessarju wara test minimizzat f'konċentrazzjoni waħda, dan jista' jsir bit-tieni konċentrazzjoni. Jekk ir-riżultati jkunu konsistenti, jista' ma jsirx test ieħor shiħ f'konċentrazzjoni differenti, peress li l-bijokonċentrazzjoni tas-sustanza ma tkunx mistennija li tkun dipendenti mill-konċentrazzjoni. Jekk it-test minimizzat sar f'żewġ konċentrazzjonijiet, u r-riżultati ma juru ebda dipendenza mill-konċentrazzjoni, it-test shiħ jista' jsir b'konċentrazzjoni waħda biss (ara l-paragrafu 87).

Rapport tat-test

Ir-rapport tat-test għat-test minimizzat għandu jinkludi l-informazzjoni kollha mitluba għat-test shiħ (ara l-paragrafu 81), hlief dik li ma tistax tiġi elaborata (jiġifieri kurva li turi l-hin għall-istat stazzjonarju u l-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju; għal dan tal-aħhar, minflok għandu jinghata l- BCF_{ss} minimizzat). Barra minn hekk, għandu jinkludi wkoll ir-raġuni għall-użu tat-test minimizzat u l- BCF_{Km} li jirriżulta.

C.13 — III TEST TAL-BIJOAKKUMULAZZJONI B'ESPONIMENT DJETETIKU FIL-HUT**INTRODUZZJONI**

Il-metodu deskritt f'din is-sezzjoni għandu jintuża għal sustanzi li fihom il-metodoloġija ta' esponiment milwiem ma tkunx prattikabbli (pereżempju għaliex ma jistgħux jinżammu konċentrazzjonijiet stabbli u li jistgħu jitkejlu fl-ilma, jew inkella ma jistgħux jinkisbu preżenzi adegwati fil-ġisem fi żmien 60 jum mill-esponiment; ara s-sezzjonijiet preċedenti fuq il-metodu ta' esponiment milwiem). Izda ta' min jagħraf li l-punt ta' tmiem minn dan it-test sejjer ikun fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetiku (BMF) minflok fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF) ⁽²⁾.

F'Mejju 2001, fil-konferenza ta' SETAC Europe li saret f'Madrid (36) gie pprezentat metodu gdid għall-itestjar tal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi organiċi ftit li xejn solubbli fl-ilma. Dan bena fuq bosta studji tal-bijoakkumulazzjoni rrapportati fit-tagħrif bl-użu ta' metodu tad-dożaġġ li kien jinvolvi għalf miżjud (eż. (37)). Kmieni fl-2004, abbozz ta' protokoll (38), imfassal sabiex ikejjel il-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi organiċi ftit li xejn solubbli fl-ilma li għalihom il-metodu ta' bijokonċentrazzjoni standard ta' esponiment fl-ilma ma

⁽¹⁾ Meta jitkejlu żewġ punti ta' deġta biss, l-istimi tal-limiti ta' kunfidenza għall- BCF_{Km} jistgħu jsiru bl-użu ta' metodi bootstrap. Meta jkun hemm anki punti ta' deġta intermedji disponibbli, il-limiti ta' kunfidenza għall- BCF_{Km} jistgħu jiġu kkalkolati bħal fit-test shiħ.

⁽²⁾ Ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet u unitajiet

▼ M7

kienx prattikabbli, flimkien ma' dokument ta' sfond ta' sostenn (39), ġie sottomess lil grupp ta' hidma tal-UE dwar il-PBT. Gustifikazzjoni ulterjuri mogħtija għall-metodu kienet li l-esponiment ambjentali potenzjali għal sustanzi f'it li xejn solubbli bħal dawn (jiġifieri $\log K_{OW} > 5$) jista' jsehh l-iktar mad-dieta (ara (40) (41) (42) (43) (44)). Għalhekk, isir riferiment għal testijiet tal-esponiment djetetiku f'ċerti regolamenti ppubblikati dwar is-sustanzi kimiċi⁽¹⁾. Madankollu, għandu jiġi realizzat li, fil-metodu deskritt hawnhekk, l-esponiment permezz tal-fażi milwiema tiġi evitata bir-reqqa u, b'hekk, valur tal-BMF minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jitqabbel direttament ma' valur tal-BMF minn studju prattiku (li fih jistgħu jiġu kombinati l-esponiment mill-ilma kif ukoll l-esponiment djetetiku).

Din is-sezzjoni ta' dan il-metodu ta' ttestjar hija bbażata fuq dan il-protokoll (38) u hija metodu ġdid li ma deherx fil-verżjoni ta' qabel tat-TM C.13. Dan it-test alternattiv jippermetti sabiex il-passaġġ ta' esponiment djetetiku jiġi investigat direttament f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati.

L-investigaturi potenzjali għandhom jirreferu għall-paragrafi 1 sa 14 ta' dan il-metodu ta' ttestjar għal informazzjoni dwar meta t-test tal-esponiment djetetiku jista' jkun ippreferut fuq it-test tal-esponiment milwiem. Informazzjoni dwar il-bosta kunsiderazzjonijiet tas-sustanza tiġi stabbilita, u għandha tiġi kkunsidrata qabel ma jsir test.

L-użu ta' sustanzi tat-test radjotikkettati jista' jitqies b'kunsiderazzjonijiet simili bħall-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafi 6 u 65).

Il-metodu djetetiku jista' jintuza sabiex jiġu ttestjati iktar minn sustanza waħda f'test wiehied, diment li jkunu ssodisfati ċerti kriterji; dawn huma mistharrġin iktar fil-paragrafu 112. Għas-semplicità, il-metodoloġija hawnhekk tiddekrivi test li juża sustanza waħda biss tat-test.

It-test djetetiku huwa simili għall-metodu ta' esponiment milwiem f'diversi aspetti, bl-eċċezzjoni ovvja tar-rotta ta' esponiment. B'hekk, hafna aspetti tal-metodu deskritt hawnhekk huma l-istess bħall-metodu ta' esponiment milwiem deskritt fis-sezzjoni ta' qabel. Safejn possibbli saret kontroreferenza għall-paragrafi rilevanti fis-sezzjoni ta' qabel, iżda fl-interessi ta' legibbiltà u fehim, ċertu ammont ta' dupplikazzjoni huwa inevitabbli.

IL-PRINCIPJU TAT-TEST

Jistgħu jintużaw kundizzjonijiet bi fluss kontinwu jew semistatiċi (ara l-paragrafu 4); kundizzjonijiet bi fluss kontinwu huma rrakkomandati sabiex jiġi limitat l-esponiment potenzjali tas-sustanza tat-test permezz tal-ilma bħala riżultat ta' kwalunkwe desorbiment minn ikel miżjud jew rawt. It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet: it-tehid (għalf miżjud bis-sustanza tat-test) u tisfija (għalf nadif mhux ittrattat) (ara l-paragrafu 16). Fil-fażi ta' tehid, grupp tat-"test" ta' hut jingħata dieta stabbilita ta' ikel kummerċjali għall-hut b'kompożizzjoni magħrufa, miżjud bis-sustanza tat-test, kuljum. Idealment il-hut għandu jikkonsma l-ikel kollu offrut (ara l-paragrafu 141). Imbagħad il-hut jingħata ikel kummerċjali għall-hut mhux ittrattat u pur matul il-fażi ta' tisfija. Bħall-metodu ta' esponiment milwiem, jekk ikun hemm bżonn jistgħu jintużaw iktar minn grupp tat-test wiehied b'konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test miżjuda differenti, iżda għall-parti l-kbira ta' sustanzi tat-test organiċi ferm idrofobiċi, grupp tat-test wiehied huwa biżżejjed (ara l-paragrafi 49 u 107). Jekk jintużaw kundizzjonijiet semistatiċi, il-hut għandu jiġi ttrasferit f'medium ġdid u/jew kompartment tat-test ġdid fi

⁽¹⁾ Għall-fini tar-Regolament (KE) Nru 1907/2006 dwar ir-registrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH) (ĠU L 396, 30.12.2006, p. 1), din il-kwistjoni hija indirizzata fil-"Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment", kapitolu R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; u l-figura R7.10-2.

▼ M7

tmien il-fażi ta' tehid (f'każ li l-medium u/jew l-apparat użat fil-fażi ta' tehid jiġi kontaminat bis-sustanza tat-test matul il-lixxivjazzjoni). Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fil-hut jitkejlu fiż-żewġ fażijiet tat-test. Minbarra l-grupp tal-hut mogħti d-dieta miżjuda (il-grupp tat-test), grupp tal-kontroll tal-hut jinżamm fl-istess kundizzjonijiet u jingħata l-istess ikel ħlief li d-dieta tal-ikel kummerċjali għall-hut ma tkunx miżjuda bis-sustanza tat-test. Dan il-grupp tal-kontroll jippermetti sabiex ikunu jistgħu jiġu kkwantifikati l-livelli ta' sfond tas-sustanza tat-test f'hut mhux espost u jservi bħala paragun għal kwalunkwe effett avvers relatat mat-trattament osservat fil-grupp(i) tat-test⁽¹⁾. Jippermetti wkoll li jitqabblu l-kostanti tar-rati ta' tkabbir bejn il-gruppi bħala verifika li ġew ikkonsmati kwantitajiet simili tad-dieta offruta (differenzi potenzjali fil-palatabilità bejn id-dieti għandhom jiġu kkunsidrati wkoll meta jiġu spjegati l-kostanti tar-rati ta' tkabbir differenti; ara l-paragrafu 138). Importanti li matul il-fażi ta' tehid kif ukoll ta' tisfija, il-gruppi tat-test u tal-kontroll jingħataw dieti ta' ekwivalenza nutrizzjonali.

Fażi ta' tehid li ddum 7-14-il jum generalment tkun biżżejjed, fuq il-bażi tal-esperjenza miksuba minn dawk li żviluppaw il-metodu (38) (39). Din il-medda għandha tnaqqas il-kost tat-twettiq tat-test filwaqt li tiżgura biżżejjed esponiment għal hafna mis-sustanzi. Madankollu, f'ċerti każijiet, il-fażi ta' tehid tista' tiġi estiża (ara l-paragrafu 127). Matul il-fażi ta' tehid, il-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-hut jaf ma tilhaqx stat stazzjonarju, u b'hekk id-dejta dwar it-trattament u r-risultati minn dan il-metodu normalment ikunu bbażati fuq analiżi kinetika tar-residwi tat-tessut. (Nota: L-ekwazzjonijiet għall-istima taż-żmien għall-istat stazzjonarju jistgħu jiġu applikati hawnhekk bħal fil-każ tat-test tal-esponiment milwiem — ara l-Appendiċi 5). Il-fażi ta' tisfija tibda meta l-hut l-ewwel jingħata dieta mhux miżjuda u tipikament iddum sa 28 jum jew sakemm is-sustanza tat-test ma tkunx tista' tibqa' tiġi kkwantifikata fil-hut shih, skont liema jiġi l-ewwel. Il-fażi ta' tisfija tista' titqassar jew tittawwal iktar minn 28 jum, skont il-bidla biż-żmien fil-konċentrazzjonijiet kimiċi mkejl in u d-daqs tal-hut.

Dan il-metodu jippermettu li tiġi stabbilita n-nofs haġja speċifika għas-sustanza ($t_{1/2}$, mill-kostant tar-rata ta' tisfija, k_2), l-effiċjenza ta' assimilazzjoni (l-assorbiment fl-imsaren; a), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika (BMF_K), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika kkoreġut għat-tkabbir (BMF_{Kg}), u l-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika kkoreġut għal-lipidu⁽²⁾ (BMF_{KL}) (u/jew il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika kinetika kkoreġut għat-tkabbir u l-lipidu, BMF_{KgL}) għas-sustanza tat-test fil-hut. Bħal fil-metodu ta' esponiment milwiem, zieda fil-massa tal-hut matul it-test sejra tirriżulta f'dilwizzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut li qiegħed jikber u, b'hekk, il-BMF kinetiku sejjer jiġi sottovalutat jekk ma jiġix ikkoreġut għat-tkabbir (ara l-paragrafi 162 u 163). Barra minn hekk, jekk jiġi stmat li l-istat stazzjonarju ntlahaq fil-fażi ta' tehid, jista' jiġi kkalkolat BMF indikattiv fi stat stazzjonarju. Hemm approċċi disponibbli li jagħmluha possibbli li jiġi stmat fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) minn dejta ġġenerata fl-istudju djetetiku (ez. (44) (45) (46) (47) (48)). Il-vantaġġi u l-iżvantaġġi tat-tali approċċi huma diskussi fl-Appendiċi 8.

⁽¹⁾ Għal hafna mis-sustanzi tat-test, idealment ma għandu jkun hemm ebda individwazzjoni fl-ilma tal-kontroll. Il-konċentrazzjonijiet ta' sfond għandhom ikun rilevanti biss għal materjali li jsehhu naturalment (ez. ċerti metalli) u sustanzi li ssibhom faċilment fl-ambjent.

⁽²⁾ Peress li l-BMF huwa definit bħala l-proporzjon tal-konċentrazzjoni ta' sustanza f'organizmu għal dik fl-ikel tal-organizmu fi stat stazzjonarju, il-lipidu jiġi kkunsidrat billi ssir korrezzjoni għall-kontenuti ta' lipidu fl-organizmu u fl-ikel, u b'hekk jiġi deskritt b'mod iktar preċiż bħala "korrezzjoni". Dan l-approċċ ivarja min-"normalizzazzjoni" sabiex jiġi stabbilit kontenut lipidu ta' organismu kif isir fit-test tal-bijokonċentrazzjoni tal-esponiment milwiem.

▼ M7

It-test tfassal primarjament għal sustanzi organiċi mhux polari ftit li xejn solubbli li jsegwu kinetika ta' tehid u tisfija ta' bejn wiehed u iehor l-ewwel ordni fil-hut. F'każ li tiġi ttestjata sustanza li ma ssegwix kinetika ta' tehid u tisfija ta' bejn wiehed u iehor l-ewwel ordni, għandhom jintużaw mudelli iktar kumplessi (ara r-referenzi fl-Appendiċi 5) u għandu jitfittex parir minn espert tal-bijostatistika u/jew tal-farmakokinetika.

Normalment il-BMF jiġi stabbilit bl-użu ta' analiżi tas-sustanza tat-test tal-huta shiha (bażi tal-piż niedi). Jekk rilevanti għall-oġġettivi tal-istudju, tessuti speċifiċi (eż. muskolu, fwied) jistgħu jiġu kampjunati jekk il-hut jinqasam f'partijiet li jittiekl u li ma jittiklux (ara l-paragrafu 21). Barra minn hekk, jistgħu jsiru tnehhija u analiżi separata tal-apparat gastrointestinali sabiex tiġi stabbilita l-kontribuzzjoni għall-konċentrazzjonijiet tal-hut shih għal punti tal-kampjun fi tmien il-fażi ta' tehid u qrib il-bidu tal-fażi ta' tisfija, jew bhala parti minn approċċ ta' bilanċ tal-massa.

Għandu jitkejjel il-kontenut lipidu ta' hut shih kampjunat sabiex il-konċentrazzjonijiet ikunu jistgħu jiġu kkoreġuti għal-lipidu, filwaqt li jitqies il-kontenut lipidu tad-dieta kif ukoll tal-hut (ara l-paragrafi 56 u 57, u l-Appendiċi 7).

Il-piż tal-hut ta' individwi fil-kampjun għandu jitkejjel u jiġi rreġistrat, u jkun marbut mal-konċentrazzjoni kimika analizzata għal dak l-individwu (eż. irrapportat bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull huta kampjunata), għall-fini ta' kalkolu tat-tkabbir li jista' jsehh matul it-test. It-tul totali tal-hut għandu jitkejjel ukoll, meta possibbli ⁽¹⁾. Id-dejta dwar il-piż hija mehtieġa wkoll sabiex jiġi smat il-BCF bl-użu ta' dejta dwar it-tisfija mit-test djetetiku.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Għandu jkun hemm għad-dispożizzjoni informazzjoni dwar is-sustanza tat-test kif deskritta fil-paragrafi 3 u 22. Normalment ma jkunx hemm bżonn li jsir metodu analitiku għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fl-ilma; huma mehtieġa metodi b'sensittività xierqa għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet fl-ikel tal-hut u t-tessut tal-hut.

Il-metodu jista' jintuża sabiex jiġu ttestjati iktar minn sustanza wahda f'test wiehed. Madankollu, is-sustanzi tat-test għandhom ikunu kompatibbli ma' xulxin sabiex ma jinteragixxux u lanqas ma jibdlu l-identità kimika tagħhom malli jizjeddu fl-ikel tat-test. L-ghan huwa li r-riżultati mkejl għal kull sustanza ttestjata flimkien ma jvarjawx hafna mir-riżultati li jinkisbu li kieku t-testijiet individwali saru fuq kull sustanza tat-test. Il-hidma analitika preliminari għandha tistabbilixxi li kull sustanza tista' tiġi rkuprata minn kampjun tal-ikel miżjud b'mod multiplu u tessut tal-hut bi i) rkupru għoljin (eż. > 85 % tan-nominal) u ii) is-sensittività neċessarja għall-ittestjar. Id-doża totali tas-sustanzi ttestjati flimkien għandha tkun inqas mill-konċentrazzjoni kombinata li tista' tikkaguna effetti tossiċi (ara l-paragrafu 51). Barra minn hekk, effetti avversi possibbli fil-hut u l-potenzjal għal effetti interattivi (eż. effetti metabolici) assoċjati mal-ittestjar ta' bosta sustanzi fl-istess hin għandhom jittiehdu f'kunsiderazzjoni fid-disinn sperimentali. Għandu jiġi evitat milli jiġu ttestjati sustanzi jonizzabbli fl-istess hin. F'termini tal-esponiment, il-metodu huwa xieraq ukoll għal tahlitiet kumplessi (ara l-paragrafu 13, għad li sejr in japplikaw l-istess limitazzjonijiet fl-analiżi bħal għal kwalunkwe metodu iehor).

VALIDITÀ TAT-TEST

Sabiex test ikun validu, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin (ara l-paragrafu 24):

— Il-varjazzjoni fit-temperatura hija inqas minn ± 2 °C fil-gruppi tat-trattament jew tal-kontroll.

⁽¹⁾ It-tul totali għandu jiġi rreġistrat ukoll matul it-test peress li huwa indikatur tajjeb ta' jekk sehhx effett avvers.

▼ **M7**

- Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt ma taqax taht is-60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja
- Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel tal-hut qabel u fi tmiem il-fażi ta' tehid taqa' fi hdan medda ta' ± 20 % (fuq il-bażi ta' tal-inqas tliet kampjuni fiż-żewġ punti ta' żmien)
- Għandu jintwera grad għoli ta' omoġenità tas-sustanza fl-ikel fil-hidma analitika preliminari fid-dieta miżjuda; tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tal-kampjun għas-sustanza mehuda fil-bidu tat-test ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn ± 15 % mill-medja
- Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mhumiex individwati, jew huma preżenti biss fl-ivelli ta' traċċi tipiċi, f'ikel mhux miżjud jew tessuti tal-hut tal-kontroll relatati mal-kampjuni ttrattati
- Il-mortalità jew effetti avversi oħrajn/mard kemm fil-hut tal-grupp tal-kontroll kif ukoll dak tal-grupp tat-test għandhom ikunu ≤ 10 % fi tmiem it-test; jekk it-test jiġi estiż għal xi raġuni, l-effetti avversi fiż-żewġ gruppi għandhom ikunu ≤ 5 % fix-xahar, u ≤ 30 % b'mod kumulattiv. Differenzi sinifikanti fit-tkabbir medju bejn il-gruppi tat-test u tal-kontroll tal-hut kampjunat jistgħu jkunu indikazzjoni ta' effett tossiku tas-sustanza tat-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

Jekk laboratorju ma jkunx għamel l-assaġġ qabel jew jekk ikunu saru bidliet sostanzjali (eż. bidla fir-razza tal-hut jew tal-fornitur, speċi tal-hut differenti, bidla sinifikanti fid-daqs tal-hut, l-ikel tal-hut jew il-metodu ta' żieda tas-sustanza, eċċ.) huwa rrakkomandat li jsir studju tal-profiċjenza teknika, bl-użu ta' sustanza ta' referenza. Is-sustanza ta' referenza tintuża primarjament sabiex jiġi stabbilit jekk it-teknika ta' żieda tas-sustanza mal-ikel hijiex adegwata sabiex jiġu żgurati omoġenità u bijodisponibilità massimi tas-sustanzi tat-test. Eżempju minnhom li ntuża fil-każ ta' sustanzi idrofobiċi mhux polari huwa l-essaklorobenżen (HCB), iżda għandhom jiġu kkunsidrati sustanzi oħrajn b'dejta affidabbli eżistenti dwar it-tehid u l-bijomanjiġfikazzjoni minhabba l-proprjetà dannuża tal-HCB ⁽¹⁾. Jekk tintuża, fir-rapport tat-test għandha tiġi ppreżentata informazzjoni bażika dwar is-sustanza ta' referenza, inkluż l-isem, il-purità, in-numru CAS, l-istruttura, id-dejta dwar it-tossiċità (jekk disponibbli) bħal fil-każ tas-sustanzi tat-test (ara l-paragrafi 3 u 22).

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Apparat**

Il-materjali u l-apparat għandhom jintużaw kif deskritt fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 26). Għandha tintuża sistema tat-test tat-tiġdid bi fluss kontinwu jew statiku li ttipprovdi volum biżżejjed ta' ilma ta' dilwizzjoni għat-tankijiet tat-test. Ir-rati tal-fluss għandhom jiġu rreġistrati

Ilma

L-ilma tat-test għandu jintuża kif deskritt fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafi 27-29). Il-medium tat-test għandu jkun ikkaratterizzat kif spjegat u l-kwalità tiegħu għandha tibqa' konsistenti matul it-test. Il-kontenut ta' partiċelli naturali u l-karbonju organiku totali għandhom ikunu baxxi kemm jista' jkun (≤ 5 mg/l materja partikolata; ≤ 2 mg/l karbonju organiku totali) qabel ma jibda t-test. It-TOC trid titkejjel biss għall-it-test bħala parti mill-karatterizzazzjoni tal-ilma tat-test (ara l-paragrafu 53).

⁽¹⁾ HCB huwa elenkat fl-Annessi A u C għall-Konvenzjoni ta' Stokkolma, u fl-Annessi I u III tar-Regolament (KE) Nru 850/2004 dwar pollutanti organiċi persistenti (GU L 158, 30.4.2004, p. 7)

▼ M7

Dieta

Huwa rakkomandat ikel kummerċjalment disponibbli għall-hut (dieta f'gerbub li jżomm fil-wieċ u/jew li jegħreq bil-mod) li huwa kkaratterizzat f'termini ta' tal-inqas kontenut ta' proteina u ta' xaham. L-ikel għandu jkollu qies uniformi tal-gerbub sabiex tiżdied l-effiċjenza tal-esponiment tal-għalf, jiġifieri l-hut sejjer jiekol iktar ikel minflok ma jiekol il-bieċiet il-kbar u jitlef iż-żgħar. Il-gerbub għandu jkun ta' qies xieraq għad-daqs tal-huta fil-bidu tat-test (eż. jistgħu jintużaw dijametri tal-gerbub ta' madwar 0.6-0.85 mm għal hut ta' tul totali ta' bejn 3 u 7 cm, u 0.85-1.2 mm għal hut ta' tul totali ta' bejn 6 u 12-il cm). Id-daqs tal-gerbub jista' jiġi rranġat skont kemm jikber il-hut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija. Eżempju ta' kompożizzjoni xierqa tal-ikel, kif fornit kummerċjalment, jingħata fl-Appendiċi 7. Id-dieti tat-test b'kontenut lipidu totali ta' bejn 15 u 20 % (w/w) intużaw ta' spiss fl-iżvilupp ta' dan il-metodu. Ikel tal-hut b'konċentrazzjoni lipidica tant għolja jaf ma jkunx disponibbli f'ċerti reġjuni. F'dawn il-każijiet, jistgħu jsiru studju b'konċentrazzjoni lipidica inqas fl-ikel u, jekk ikun hemm bżonn, ir-rata tal-għalf tiġi aġġustata kif xieraq sabiex tinzamm is-saħħa tal-hut (fuq il-bażi tal-ittestjar preliminari). Il-kontenut lipidu totali tad-dieti tal-grupp tat-test u tal-grupp tal-kontroll irid jtejjel u jiġi rreġistrat qabel ma jibda t-test u fi tmiem il-fażi ta' tehid. Id-dettalji pprovduti mill-fornitur tal-għalf kummerċjali tal-analiżi għal nutrijenti, umdità, fibra u rmied u, jekk possibbli, minerali u residwi ta' pesticidi (eż. sustanzi niġġiesa "standard" ta' prijorità), għandhom jiġu ppreżentati fir-rapport tal-istudju.

Meta l-ikel jiġi miżjud bis-sustanza tat-test, għandhom isiru l-isforzi kollha possibbli sabiex tiġi żgurata omoġenità fl-ikel tat-test. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel għall-grupp tat-test għandha tingħażel filwaqt li titqies is-sensittività tat-teknika analitika, it-tossicità tas-sustanza tat-test (NOEC, jekk magħrufa) u d-dejta fizikokimika rilevanti. Jekk tintuża, idealment is-sustanza ta' referenza għandha tiġi inkorporata f'konċentrazzjoni ta' madwar 10 % ta' dik tas-sustanza tat-test (jew fi kwalunkwe każ fl-inqas mod prattikabbli), soġġetta għas-sensittività tal-analiżi (eż. għall-essaklorobenżen, instab li konċentrazzjoni fl-ikel ta' 1-100 µg/g hija aċċettabbli; ara (47) għal iktar informazzjoni dwar l-effiċjenzi ta' assimilazzjoni tal-HCB).

Is-sustanza tat-test tista' tiġi miżjuda mal-ikel tal-hut b'bosta modi skont il-karatteristiċi fiżiċi u s-solubilità tagħha (ara l-Appendiċi 7 għal iktar dettalji dwar il-metodi ta' kif tiżdied is-sustanza):

- Jekk is-sustanza hija solubbli u stabbli fit-trigliceridi, is-sustanza għandha tiġi dissolta f'ammont żgħir ta' żejt tal-hut jew żejt veġetali li jittiekel qabel ma tithallat mal-ikel tal-hut. F'dan il-mument, għandha tingħata attenzjoni sabiex tiġi evitata l-produzzjoni ta' porzjon li jkun għoli wisq fl-lipidu, filwaqt li jitqies il-kontenut lipidu naturali tal-għalf miżjud, billi tiżdied il-kwantità magħrufa minima ta' żejt mehtieġa sabiex jinkisbu distribuzzjoni u omoġenità tas-sustanza tat-test fl-ikel, jew;
- L-ikel għandu jiġi miżjud bl-użu ta' solvent organiku xieraq, diment li l-omoġenità u l-bijodisponibilità ma jitlewqgħux f'riskju (huwa possibbli li jiffurmaw (mikro)kristalli tas-sustanza tat-test fl-ikel minhabba l-evaporazzjoni tas-solvent u ma hemm ebda mod faċli kif jintwera bil-provi li dan ma seħħx; ara. (49)), jew;
- Likwidi mhux viskużi għandhom jiżdiedu direttament mal-ikel tal-hut iżda għandhom ikunu mhalltin sew għall-finijiet ta' omoġenità u sabiex tiġi ffacilitata assimilazzjoni tajba. It-teknika għat-thallit għandha tiżgura omoġenità tal-għalf miżjud.

▼ **M7**

Fi ftit każijiet, eż. sustanzi tat-test inqas idrofobiċi b'tendenza ikbar ta' disorbiement mill-ikel, jista' jkun hemm bżonn li l-gerbub tal-ikel ippreparati jinksew bi kwantità żgħira ta' żejt tal-hut/tal-qamhirrum (ara l-paragrafu 142). F'dawn il-każijiet, l-ikel tal-kontroll għandu jiġi ttrattat b'mod simili u l-ghalf ippreparat finali jintuża għall-kejl tal-lipidu.

Jekk tintuża, ir-riżultati tas-sustanza ta' referenza għandhom jitqabblu mad-dejta mill-istudji tat-tagħrif imwettqin f'kundizzjonijiet simili b'rata tal-ghalf komparabbli (ara l-paragrafu 45) u l-parametri speċifiċi għas-sustanza ta' referenza għandhom jissodisfaw il-kriterji rilevanti fil-paragrafu 113 (it-3^{et}, ir-4^a u l-5^{es} punti).

Jekk jintuża żejt jew solvent trasportatur bħala veikolu għas-sustanza tat-test, ammont ekwivalenti tal-istess veikolu (eskluzja s-sustanza tat-test) għandu jithallat mad-dieta tal-kontroll sabiex tinżamm l-ekwivalenza mad-dieta miżjuda. Importanti li matul il-fażi ta' tehid kif ukoll ta' tisfija, il-gruppi tat-test u tal-kontroll jingħataw dieti ta' ekwivalenza nutrizzjonali.

Id-dieta miżjuda għandha tinhażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-istabilità tas-sustanza tat-test fi hdan it-tahlita tal-ghalf (eż. tkessiġ) u dawn il-kundizzjonijiet għandhom jiġu rrapportati.

Għażla tal-ispeċi ta' hut

Tista' tintuża l-ispeċi ta' hut kif speċifikati għall-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 32 u l-Appendiċi 3). Trota qawsalla (*Oncorhynchus mykiss*), karpjun komuni (*Cyprinus carpio*) u karpjun buras (*Pimephales promelas*) intużaw ta' spiss fi studji tal-bijoakkumulazzjoni djetetika b'sustanzi organiċi qabel ma ġie pubblikat dan it-TM. L-ispeċi tat-test għandu jkollha mgħiba tal-ghalf li tirriżulta f'konsum rapidu tal-proporzjon tal-ikel amministrat sabiex jiġi żgurat li kwalunkwe fattur li jinfluwenza l-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel (eż. lixxivjazzjoni fl-ilma u l-possibbiltà ta' esponiment milwiem) jinżamm għall-minimu. Għandu jintuża hut fi hdan il-medda ta' qies/piż rakkomandat (ara l-Appendiċi 3). Il-hut ma għandux ikun żgħir wisq tant li jxekkel il-faċilità tal-analiżijiet fuq bażi individwali. Speċi tal-hut ittestjata fi stadju tal-hajja bi tkabbir rapidu (meta jkun għadu qed jikber) jista' jikkompjika l-interpretazzjoni tad-dejta, u rati ta' tkabbir għoljin jistgħu jinfluwenzaw il-kalkolu tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni ⁽¹⁾.

Iż-żamma tal-hut

Il-kriterji ta' akklimatizzazzjoni, mortalità u aċċettazzjoni tal-mard huma l-istess bħal tal-metodu tal-esponiment milwiem qabel it-tweqqif tat-test (ara l-paragrafi 33-35).

IT-TWETTIQ TAT-TEST

Il-hidma ta' qabel l-istudju u t-test tas-sejbien tal-medda

Hemm bżonn li ssir hidma analitika ta' qabel l-istudju sabiex jintwera l-irkupru tas-sustanza minn ikel miżjud/tessut tal-hut miżjud. Mhux bilfors dejjem ikun hemm bżonn li jsir test tas-sejbien tal-medda sabiex tingħażel konċentrazzjoni xierqa fl-ikel. Sabiex jintwera li ma huwa osservat ebda effett avvers u tiġi evalwata l-palatabilità tad-dieta miżjuda, is-sensittività tal-metodu analitiku

⁽¹⁾ Għat-tkabbir rapidu matul il-fażi ta' tehid, ir-rata tal-ghalf vera sejra tonqos f'livell taht dik stabbilita fil-bidu tal-esponiment.

▼ **M7**

għat-tessut tal-hut u l-ikel, u jingħazlu rata tal-ghalf u intervalli tal-kampjunar xierqa matul il-fażi ta' tisfija, eċċ., jistgħu jsiru esperimenti preliminari dwar l-ghalf, iżda dawn mhumiex obbligatorji. Studju preliminari jista' jkun siewi sabiex jiġu stmati n-numri ta' hut mehtieġa għall-kampjunar matul il-fażi ta' tisfija. Dan jista' jirriżulta fi tnaqqis sinifikanti fin-numru ta' hut użat, speċjalment għal sustanzi tat-test li jkunu partikolarment suxxettibbli għall-metabolizmu.

Kundizzjonijiet tal-Esperiment*Durata tal-Fażi ta' Tehid*

Fażi ta' tehid ta' 7-14-il jum normalment tkun biżżejjed, li matulha grupp wiehed ta' hut jingħata d-dieta tal-kontroll u grupp ieħor ta' hut id-dieta tat-test kuljum b'porzjon fissa skont l-ispeċi ttestjata u l-kundizzjonijiet tal-esperiment, eż. bejn 1-2 % tal-piż tal-ġisem (piż niedi) fil-każ ta' trota qawsalla. Ir-rata tal-ghalf għandha tingħazel b'tali mod li jiġu evitati tkabbir veloċi u żieda kbira fil-kontenut lipidu. Jekk ikun hemm bżonn, il-fażi ta' tehid tista' tiġi estiza fuq il-bażi tal-esperjenza Prattika minn studji preċedenti jew l-gharfien dwar it-tehid/-tisfija tas-sustanza tat-test (jew analoġu) fil-hut. Il-bidu tat-test huwa definit bħala l-hin tal-ewwel għalf b'ikel miżjud. Jum sperimentali jibda mill-hin tal-ghalf sa ftit qabel il-hin tal-ghalf li jmiss (eż. siegħa). B'hekk, l-ewwel jum sperimentali tat-tehid jibda mill-hin tal-ewwel għalf b'ikel miżjud u jintemm ftit qabel it-tieni għalf b'ikel miżjud. Fil-prattika, il-fażi ta' tehid tintemm ftit qabel (eż. siegħa) l-ewwel għalf b'sustanza tat-test mhux miżjuda filwaqt li l-hut ikompli jiddiġerixxi l-ikel miżjud u jassorbi s-sustanza tat-test fl-24 siegħa ta' wara. Importanti li jiġi żgurat li tinkiseb preżenza fil-ġisem għolja biżżejjed (mhux tossika) tas-sustanza tat-test fir-rigward tal-metodu analitiku, sabiex tal-inqas ikun jista' jitkejjel tnaqqis ta' ordni ta' kobor matul il-fażi ta' tisfija. F'każijiet speċjali, tista' tintuża fażi ta' tehid estiza (sa 28 jum) b'kampjunar addizzjonali sabiex tinkiseb idea ta' kif taħdem il-kinetika tat-tehid. Matul it-tehid, il-konċentrazzjoni fil-hut tista' ma tilhaqx stat stazzjonarju. L-ekwazzjonijiet għall-istima taż-żmien għall-istat stazzjonarju, bħala indikazzjoni tad-durata probabbli mehtieġa sabiex jinkisbu konċentrazzjonijiet tal-hut sinifikanti, jistgħu jiġu applikati hawnhekk bħal fil-każ tat-test tal-esperiment milwiem (ara l-Appendiċi 5).

F'ċerti każijiet, jista' jkun magħruf li t-tehid ta' sustanza fil-hut għal iktar minn 7-14-il jum mhuwiex sejjer ikun biżżejjed għall-konċentrazzjoni tal-ikel użata sabiex tintlaħaq konċentrazzjoni tal-hut għolja biżżejjed sabiex tal-inqas jiġi analizzat tnaqqis ta' ordni ta' kobor matul it-tisfija, jew minhabba sensitività analitika batuta jew effiċjenza tal-assimilazzjoni baxxa. F'dawn il-każijiet, jista' jkun ta' vantaġġ li l-fażi tal-ghalf inizjali tiġi estiza għal iktar minn 14-il jum, jew, speċjalment għal sustanzi ferm metabolizzabbli, għandha tiġi kkunsidrata konċentrazzjoni djetetika oghla. Madankollu, għandha tingħata attenzjoni sabiex it-toqol tal-ġisem matul it-tehid jinżamm inqas mill-konċentrazzjoni kronika (stmata) bla effett osservat fit-tessut tal-hut (ara l-paragrafu 138).

Durata tal-fażi ta' tisfija

It-tisfija normalment iddum 28 jum, u tibda malli l-hut tal-grupp tat-test jingħata dieta mhux ittrattata u pura wara l-fażi ta' tehid. It-tisfija tibda bl-ewwel tagħlif ta' ikel "mhux miżjud" minflok eżatt wara l-aħħar tagħlif ta' ikel "miżjud" peress li l-hut sejjer ikompli jiddiġerixxi l-ikel u jassorbi s-sustanza tat-test fl-24 siegħa ta' wara, kif osservat fil-paragrafu 126. B'hekk, l-ewwel kampjun fil-fażi ta' tisfija

▼ M7

jittiehed ftit wara t-tieni tagħlif bid-dieta mhux miżjuda. Dan il-perjodu ta' tisfija huwa mfassal sabiex ikopri sustanzi b'nofs haġja potenzjali li tasal sa 14-il jum, li hija konsistenti ma' dik ta' sustanzi b'joakkumulattivi⁽¹⁾, u b'hekk 28 jum jinvolvu żewġ nofs haġjiet ta' sustanzi b'hal dawn. F'każijiet ta' sustanzi b'joakkumulazzjoni għolja haġja, jista' jkun siewi li tiġi estiża l-fażi ta' tisfija (jekk indikata mill-ittestjar preliminari).

Jekk sustanza tissaffa bil-mod haġja b'tali mod li jaf ma tiġix stabbilita nofs haġja fil-fażi ta' tisfija, l-informazzjoni xorta waħda tista' tkun biżżejjed għal finijiet ta' valutazzjoni sabiex tindika livell għoli ta' b'joakkumulazzjoni. Għall-kuntrarju, jekk sustanza tissaffa tant malajr li ma tistax tinkiseb konċentrazzjoni zero f'hin affidabbli (konċentrazzjoni f' tmiem it-tehid/il-bidu tat-tisfija, $C_{0,d}$) u ma jistax jinkiseb k_2 , tista' ssir stima konservattiva tal- k_2 (ara l-Appendiċi 7).

Jekk l-analizijiet tal-hut f'intervalli bikrin (eż. 7 jew 14-il jum) juru li s-sustanza ssaġġiet f'livelli inqas minn dawg ta' kwantifikazzjoni qabel il-perjodu shih ta' 28 jum, il-kampjunar sussegwenti jista' jitwaqqaf u t-test jista' jiġi terminat.

Fi ftit każijiet, jista' ma jkun sehh ebda tehid li jitkejjel tas-sustanza tat-test f' tmiem il-perjodu tat-tehid (jew bit-tieni kampjun tat-tisfija). Jekk jista' jintwera li: i) huma ssodisfat l-kriterji ta' validità fil-paragrafu 113; u ii) nuqqas ta' tehid mhuwiex dovut għal xi nuqqas iehor fit-test (eż. durata tat-tehid mhux twila biżżejjed, nuqqas fit-teknika ta' kif tiżdied is-sustanza mal-ikel li jwassal għal bijodisponibilità batuta, nuqqas ta' sensitività tal-metodu analitiku, hut li ma jikkonsmax l-ikel, eċċ.); jista' jkun possibbli li jintemm l-istudju mingħajr il-bżonn li jerga' jsir b'durata tat-tehid itwal. Jekk il-hidma preliminari indika li dan jista' jkun il-każ, analiżi tar-rawt, jekk possibbli, għal sustanza tat-test mhux iddigerita tista' tkun rakkomandata b'hal parti minn approċċ ta' "bilanċ tal-massa".

Numri ta' hut tat-test

B'mod simili għat-test tal-esponiment milwiem, għandu jingħażel hut b'piż u tul simili, bl-iżgħar hut li ma jkunx iżgħar minn żewġ terzi tal-piż tal-ikbar (ara l-paragrafi 40-42).

In-numru totali ta' hut għall-istudju għandu jingħażel fuq il-bażi tal-iskeda ta' kampjunar (tal-inqas kampjun wiehed f' tmiem il-fażi ta' tehid u erba' sa sitt kampjuni matul il-fażi ta' tisfija, iżda skont id-durati tal-fażijiet), filwaqt li jitqiesu s-sensittività tat-teknika analitika, il-konċentrazzjoni li aktarx li sejra tinkiseb f' tmiem il-fażi ta' tehid (fuq il-bażi tal-għarfien preċedenti) u d-durata tat-tisfija (jekk tkun tista' ssir stima bis-saħħa tal-għarfien preċedenti). F'kull okkażjoni għandhom jiġu kampjunati hames sa għaxar hutiet, bil-parametri tat-tkabbir (piż u tul totali) li jitkejlu qabel l-analiżi kimika jew lipida.

Minhabba l-varjabbiltà inerenti fid-daqs, ir-rata ta' tkabbir, u l-fizjoloġija bejn il-hut u l-varjazzjoni probabbli fil-kwantità ta' dieta mogħtija li kull huta tikkonsma, għandu jittiehed kampjun ta' tal-inqas hames hutiet f'kull intervall mill-grupp tat-test u hames hutiet mill-grupp tal-kontroll sabiex tiġi stabbilita b'mod adegwat il-konċentrazzjoni medja u l-varjabbiltà tagħha. Il-varjabbiltà bejn il-hut użat aktarx li tikkontribwixxi iktar għall-varjabbiltà mhux ikkontrollata ġenerali fit-test mill-varjabbiltà inerenti fil-metodoloġiji analitiċi użati, u b'hekk tiġustifika l-użu ta' massimu ta' għaxar hutiet għal kull punt tal-kampjun f'ċerti każijiet. Madankollu, jekk il-konċentrazzjonijiet ta' sfond tas-sustanza tat-test fil-hut tal-kontroll ma jstgħux jitkejlu fil-bidu tat-tisfija, l-analiżi kimika ta' żewġ-tliet hutiet tal-kontroll fl-intervall finali tal-kampjunar biss tista' tkun biżżejjed diment li l-hut tal-kontroll li jifdal fil-punti tal-kampjunar kollha xorta waħda jiġu kampjunati għall-piż u t-tul totali (sabiex jiġi kampjunat l-istess numru mill-gruppi tat-test u tal-kontroll għat-tkabbir). Il-hut għandu jinħażen, jintiżen individwalment (anki jekk ikun necessarju li wara r-riżultati tal-kampjun jiġu kombinati) u għandu jitkejjel it-tul totali.

⁽¹⁾ Fi studju tal-esponiment milwiem, nofs haġja ta' 14-il jum tikkorrispondi għal BCF ta' madwar 10 000 L/kg bl-użu ta' hut ta' 1 g b'rata ta' tehid korrispondenti ta' madwar 500 L/kg/jum (skont l-ekwazzjoni ta' Sijm *et al* (46)).

▼ **M7**

Għal test standard, pereżempju, b'durata ta' tisfija ta' 28 jum inkluzi hames kampjuni ta' tisfija, dan ifisser total ta' 59-120 huta mit-test u 50-110 mill-gruppi tal-kontroll, jekk jiġi supponut li t-teknika analitika tas-sustanza tippermetti li l-analizi tal-kontenut lipidu ssir fuq l-istess huta. Jekk l-analizi lipidu ma tistax issir fuq l-istess huta b'hall-analizi kimika, u l-użu ta' hut tal-kontroll għall-analizi lipidu biss ma jkunx fattibbli (ara l-paragrafu 56), ikunu meħtieġa 15-il huta oħra (tlieta mill-popolazzjoni tal-istokk fil-bidu tat-test, tlieta mill-grupp tal-kontroll u tlieta mill-grupp tat-test fil-bidu tat-tisfija u tlieta mill-gruppi tal-kontroll u tlieta mill-gruppi tat-test fi tmiem l-esperiment). Eżempju tal-iskeda tal-kampjunar bin-numri tal-hut jista' jinkiseb mill-Appendiċi 4.

Tagħbija

B'mod simili, għandhom jintużaw proporzjonijiet għoljin ta' ilma għall-hut b'hal fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafi 43 u 44). Għad li r-rati ta' tagħbija tal-hut għall-ilma ma għandhomx effett fuq il-konċentrazzjonijiet tal-esponiment f'dan it-test, hija rakkomandata rata ta' tagħbija ta' 0.1-1.0 g hut (piż niedi) għal kull litru fil-gurnata sabiex jinżammu konċentrazzjonijiet adegwati tal-ossigenu dissolt u jiġi minimizzat l-istress tal-organizmi tat-test.

Dieta tat-test u Għalf

Matul il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, il-hut għandu jingħata dieta xierqa kif spjegat iktar 'il fuq (il-paragrafu 117). Jekk it-test isir f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, il-fluss għandu jkun sospiż filwaqt li jingħata l-ikel lill-hut.

Matul it-test, id-dieta għall-grupp tat-test għandha taderixxi għal dik deskritta iktar 'il fuq (paragrafi 116-121). Minbarra li jiġu kkunsidrati fatturi speċifiċi għas-sustanza, is-sensittività analitika, il-konċentrazzjoni mistennija fid-dieta f'kundizzjonijiet ambjentali u l-livelli ta' tossiċità kronika/toqol tal-ġisem, l-għażla tal-konċentrazzjoni mira taż-żieda tas-sustanza għandha tqis il-palatabilità tal-ikel (sabiex il-hut ma jevitax milli jiekol). Il-konċentrazzjoni taż-żieda nominali tas-sustanza tat-test għandha tiġi dokumentata fir-rapport. Fuq il-bażi tal-esperjenza, il-konċentrazzjonijiet taż-żidiet fil-medda ta' 1-1 000 µg/g jipprovdu medda operazzjonali prattika għas-sustanzi tat-test li ma jesibixxux mekkaniżmu tossiku speċifiku. Għal sustanzi li jaġixxu permezz ta' mekkaniżmu mhux speċifiku, il-livelli tar-residwu tat-tessut ma għandhomx jaqbuż 1-5 µmol/g lipidu peress li residwi f'livelli oġġa minn hekk aktarx li jġibu magħhom effetti kroniċi (19) (48) (50) ⁽¹⁾. Għal sustanzi oħrajn għandha tingħata attenzjoni sabiex ma jsehh ebda effetti avversi mill-esponiment akkumulat (ara l-paragrafu 127). Dan huwa partikolarment minnu jekk ikunu qegħdin jiġu ttestjati iktar minn sustanza waħda fl-istess hin (ara l-paragrafu 112).

L-ammont xieraq tas-sustanza tat-test jista' jizjed mal-ikel tal-hut f'wiehed minn tliet modi, kif spjegat fil-paragrafu 119 u l-Appendiċi 7. Il-metodi u l-proċeduri għaž-żieda tas-sustanza mal-għalf għandhom jiġu dokumentati fir-rapport. Ikel mhux ittrattat jingħata lill-hut tal-kontroll, u dan ikun fih kwantità ekwivalenti ta' veikolu taż-żejt mhux miżjud jekk dan ikun intuża fl-għalf miżjud għall-faži ta' tehid, jew li jkun ġie ttrattat b'solvent "pur" jekk intuża veikolu tas-solvent għall-preparazzjoni tad-dieta tal-grupp tat-test. Id-dieti ttrattati u mhux ittrattati għandhom jitkejlu b'mod analitiku tal-inqas fi triplikat għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test qabel ma tibda u fi tmiem il-faži ta' tehid. Wara l-esponiment għall-għalf ittrattat (faži ta' tehid), il-hut (żewġ gruppi) jingħataw ikel mhux ittrattat (faži ta' tisfija).

Il-hut jingħata porzjon fiss (skont l-ispeċi; eż. madwar 1-2 % tal-piż niedi tal-ġisem kuljum fil-każ ta' trota qawsalla). Ir-rata tal-għalf għandha tingħażel b'tali mod li jiġu evitati tkabbir veloċi u zieda kbira fil-kontenut lipidu. Għandha tiġi rreġistrata r-rata tal-għalf eżatta stabbilita matul l-esperiment. It-tagħlif inizjali għandu jkun ibbażat fuq il-kejl tal-piż skedati tal-popolazzjoni tal-istokk eżatt qabel ma jibda t-test. L-ammont tal-għalf għandu jiġi aġġustat fuq il-bażi

⁽¹⁾ Peress li l-konċentrazzjonijiet interni attwali jistgħu jiġu stabbiliti biss wara li jkun sar it-test, hemm bżonn ta' stima tal-konċentrazzjoni interna mistennija (eż. fuq il-bażi tal-BMF mistenni u l-konċentrazzjoni fl-ikel; ara l-Ekwazzjoni A5.8 fl-Appendiċi 5).

▼ **M7**

tal-piżizzjiet niedja tal-hut kampjunat f'kull okkażjoni tal-kampjunar sabiex jinghata kunsiderazzjoni lit-tkabbir matul l-esperiment. Il-piżizzjiet u t-tul tal-hut fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll jistgħu jiġu smati mill-piżizzjiet u t-tul totali tal-hut użat f'kull okkażjoni tal-kampjunar; tiżinx u tkejjilx il-hut li jifdal fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll. Importanti li tinżamm l-istess rata tal-ghalf stabbilita matul l-esperiment.

L-ghalf għandu jkun osservat sabiex jiġi żgurat li l-hut ikun qiegħed jikkonsma l-ikel kollu pprezentat sabiex jiġi garantit li fil-kalkoli jintużaw ir-rati ta' ingestjoni xierqa. L-esperimenti preliminari tal-ghalf jew l-esperjenza preċedenti għandhom jinghataw kunsiderazzjoni meta tinghażel ir-rata ta' tagħlif sabiex jiġi żgurat li jiġi kkonsmat l-ikel kollu mit-tagħlif ta' darba kuljum. F'każ li ta' spiss ikun hemm ikel li ma jintmissx, jista' jkun rakkomandat li d-doża tinfirex tul perjodu ta' tagħlif ieħor f'kull jum tal-esperiment (eż. jinbidel it-tagħlif ta' dabra kuljum ma' tagħlif ta' nofs l-ammont darbtejn kuljum). Jekk ikun hemm bżonn, it-tieni tagħlif għandu jsehh f'hin stabbilit u jinżamm il-hin sabiex jgħaddi l-perjodu massimu tal-hin possibbli qabel ma jiġi kampjunat il-hut (eż. il-hin għat-tieni tagħlif jiġi stabbilit fi hdn l-ewwel nofs ta' jum tal-esperiment).

Għad li ġeneralment il-hut malajr jikkonsma l-ikel, importanti li jiġi żgurat li s-sustanza tibqa' adsorbita fl-ikel. Għandhom isiru sforzi sabiex jiġi evitat milli s-sustanza tat-test tiġi dispersa fl-ilma mill-ikel, u b'hekk tesponi l-hut għal konċentrazzjonijiet milwiema tas-sustanza tat-test minbarra r-rotta djetetika. Dan jista' jinkiseb billi jitneħħa kwalunkwe ikel li ma jittikilx (u rawt) mit-tankijiet tat-test u tal-kontroll fi żmien siegħa mit-tagħlif, iżda idealment fi żmien 30 minuta. Barra minn hekk, tista' tintuża sistema li fiha l-ilma jitnaddaf kontinwament b'filtru tal-karbonju attiv sabiex jiġi assorbit kwalunkwe kontaminant "dissolt". Sistemi bi fluss kontinwu jistgħu jgħinu sabiex jitneħħew malajr partiċelli tal-ikel u sustanzi dissolti⁽¹⁾. F'ċerti każijiet, teknika ta' preparazzjoni tal-ikel miżjud modifikata f'it tista' tgħin sabiex tittaffa din il-problema (ara l-paragrafu 119).

Dawl u temperatura

Rigward il-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 48), huwa rakkomandat fotoperjodu ta' 12 sa 16-il siegħa u temperatura (± 2 °C) xierqa għall-ispeċi tat-test użata (ara l-Appendiċi 3). It-tip u l-karatteristiċi tad-dawl għandhom ikunu magħrufin u ddokumentati.

Kontrolli

Għandu jintuża grupp tal-kontroll wiehed, bil-hut li jinghata l-istess porzjon ta' ikel bħall-grupp tat-test iżda minghajr is-sustanza tat-test fl-ghalf. Jekk intuża żejt jew veikolu tas-solvent sabiex tiġi miżjuda s-sustanza fl-ghalf fil-grupp tat-test, l-ikel tal-grupp tal-kontroll għandu jiġi ttrattat bl-istess mod iżda minghajr is-sustanza tat-test sabiex id-dieti tal-grupp tat-test u l-grupp tal-kontroll ikunu ekwivalenti (ara l-paragrafi 121 u 139).

⁽¹⁾ Il-preżenza tas-sustanza tat-test fil-medium tat-test bħala riżultat tal-eskrezzjoni mill-hut jew lixivazzjoni mill-ikel jaf ma tkunx tista' tiġi evitat għalkollox. Għalhekk, għażla minnhom hija li titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza fl-ilma u fi tmiem il-perjodu ta' tehid, speċjalment jekk jintuża ssettjar semistatiku, bħala għajnuna sabiex jiġi stabbilit jekk sehhx xi esponiment milwiem.

▼ **M7****Il-Frekwenza tal-Kejliet tal-Kwalità tal-Ilma**

Il-kundizzjonijiet deskritti fil-metodu tal-esponiment milwiem japplikaw hawn ukoll, hlief li t-TOC trid titkejjel biss qabel it-test bħala parti mill-karatterizzazzjoni tal-ilma tat-test (ara l-paragrafu 53).

Kampjunar u Analizi tal-Hut u d-Dieta*Analizi tal-Kampjuni tad-Dieta*

Il-kampjuni tad-dieti tat-test u tal-kontroll għandhom jiġu analizzati tal-inqas fi triplikati għas-sustanza tat-test u għall-kontenut lipidu qabel ma tibda u fi tmiem il-fażi ta' tehid. Il-metodi ta' analizi u l-proċeduri għall-iżgurar u l-omoġenità tad-dietta għandhom ikunu inklużi fir-rapport.

Il-kampjuni għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test bil-metodu stabbilit u vvalidat. Għandha ssir hidma ta' qabel l-istudju sabiex jiġu stabbiliti l-limitu tal-kwantifikazzjoni, l-irkupru perċentwali, l-interferenzi u l-varjabbiltà analitika fil-matriċi tal-kampjun fil-mira. Jekk jiġi ttestjat matejal radjotikkettat, għandhom jitqiesu l-istess kunsiderazzjonijiet bħal daww għall-metodu tal-esponiment milwiem bl-analizi tal-ghalf li tiegħu post l-analizi tal-ilma (ara l-paragrafu 65).

Analizi tal-Hut

F'kull okkażjoni tal-kampjunar tal-hut, sejjer jittiehed kampjun ta' 5-10 individwi mit-trattamenti tal-esponiment u tal-kontroll (f'ċerti każijiet, in-numri ta' hut tal-kontroll jistgħu jitnaqqsu; ara l-paragrafu 134).

L-okkażjonijiet tal-kampjunar għandhom isehħu fl-istess hin f'kull jum tal-esperiment (b'rabta mal-hin tal-ghalf), u għandhom isiru f'hin li fih ma jkunx probabbli li l-ikel ikun għadu fl-imsaren matul il-fażi ta' tehid u l-parti bikrija tal-fażi ta' tisfija sabiex jiġu evitati kontribuzzjonijiet spurġi għall-konċentrazzjonijiet totali tas-sustanza tat-test (jiġifieri l-hut fil-kampjun għandu jitneħħa fi tmiem jum tal-esperiment, filwaqt li wieħed jiftakar li jum tal-esperiment jibda minn hin it-tagħlif u jintemm fil-hin tat-tagħlif li jmiss, madwar 24 siegħa wara. It-tisfija tibda bl-ewwel tagħlif ta' ikel mhux miżjud; ara l-paragrafu 128). L-ewwel kampjun tal-fażi ta' tisfija (mehud ftit wara t-tieni tagħlif b'ikel mhux miżjud) hija importanti peress li tintuża estrapolazzjoni ta' gurnata qabel minn dan il-kejl sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni fiż-żmien zero ($C_{0,d}$, il-konċentrazzjoni fil-hut fi tmiem it-tehid/il-bidu tat-tisfija). Inkella, l-apparat gastrointestinali tal-hut jista' jitneħħa u jiġi analizzat għalih fi tmiem it-tehid u fil-jiem 1 u 3 tat-tisfija.

F'kull okkażjoni tal-kampjunar, il-hut għandu jitneħħa miż-żewġ reċipjenti tat-test u jiġi trattat bl-istess mod kif deskritt fil-metodu milwiem (ara l-paragrafi 61-63).

Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fil-hut shiħ (piż niedi) jitkejlu tal-inqas fi tmiem il-fażi ta' tehid u matul il-fażi ta' tisfija kemm fil-gruppi tal-kontroll kif ukoll tat-test. Matul il-fażi ta' tisfija, huma rakkomandati erba' sa sitt punti tal-kampjunar (eż. 1, 3, 7, 14 u 28 jum). Inkella, jista' jiġi inkluz punt tal-kampjunar iehor wara t-tehid għal 1-3 jiem sabiex tiġi stmata l-effiċjenza tal-assimilazzjoni mill-fażi lineari ta' tehid għall-hut filwaqt li ż-żmien ikun għadu qrib il-perjodu tal-esponiment. Jeżistu żewġ devjazzjonijiet ewlenin mill-iskeda: i) jekk tintuża fażi ta' tehid estiża għall-finijiet ta' investigazzjoni tal-kinetika tat-tehid, sejjer ikun hemm punti tal-kampjunar addizzjonali matul il-fażi ta' tehid u, b'hekk, sejjer ikollu jintuża iktar hut (ara l-paragrafu 126); ii) jekk l-istudju għe terminat

▼ M7

fi tmiem il-fazi ta' tehid minhabba ebda tehid li jista' jitkejjel (ara l-paragrafu 131). Il-hut individwali li jittiehed fil-kampjun għandu jintiżen (u jitkejjel it-tul totali tiegħu) sabiex ikunu jistgħu jiġu stabbiliti l-kostanti tar-rata ta' tkabbir. Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza f'tessut speċifiku tal-hut (porzjonijiet li jittiekl u li ma jittiklux) jistgħu jitkejlu wkoll fi tmiem il-hinijiet ta' tehid u l-hinijiet ta' tisfija magħżulin. Jekk jiġi ttestjat matejal radjotikkettat, għandhom jitqiesu l-istess kunsiderazzjonijiet bħal dawk għall-metodu tal-esponiment milwiem bl-analizi tal-ghalf li tiehu post l-analizi tal-ilma (ara l-paragrafu 65).

Għall-użu peridiku ta' sustanza ta' referenza (ara l-paragrafu 25), idealment il-konċentrazzjonijiet jitkejlu fil-grupp tat-test fi tmiem it-tehid u fil-hinijiet ta' tisfija kollha speċifikati għas-sustanza tat-test (hut shih); il-konċentrazzjonijiet iridu jiġu analizzati biss fil-grupp tal-kontroll fi tmiem it-tehid (hut shih). F'ċerti ċirkustanzi (pereżempju jekk it-teknika tal-analizi għas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza jkunu inkompatibbli, b'tali mod li jkun hemm bżonn ta' iktar hut sabiex tiġi segwita l-iskeda tal-kampjunar), jista' jintuża approċċ ieħor kif ġej sabiex jitnaqqas in-numru ta' hut addizzjonali meħtieġ. Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ta' referenza jitkejlu matul it-tisfija biss fil-jiem 1, 3 u żewġ punti ta' kampjunar oħrajn, magħżulin b'tali mod li l-istimi affidabbli tal-konċentrazzjoni fiż-żmien zero ($C_{0,d}$) u k_2 ikunu jistgħu jsiru għas-sustanza ta' referenza.

Jekk possibbli, il-kontenut lipidu tal-hut individwali għandu jiġi stabbilit f'kull okkażjoni tal-kampjunar, jew tal-inqas fil-bidu u fi tmiem il-fazi ta' tehid u fi tmiem il-fazi ta' tisfija. (ara l-paragrafi 56 u 67). Skont il-metodu analitiku (irreferi għall-paragrafu 67 u għall-Appendiċi 4), jista' jkun possibbli li jintuża l-istess hut għad-determinazzjoni tal-kontenut lipidu kif ukoll tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test. Dan huwa ppreferut għaliex inaqqas in-numri ta' hut. Madankollu, jekk dan ma jkunx possibbli, jista' jintuża l-istess approċċ kif deskritt fil-metodu tal-esponiment milwiem (ara l-paragrafu 56 għal dawn l-għażliet alternattivi ta' kejl tal-lipidu). Il-metodu użat sabiex jiġi kkwantifikat il-kontenut lipidu għandu jiġi ddokumentat fir-rapport.

Kwalità tal-metodu analitiku

Għandhom isiru verifiki sperimentali sabiex jiġu żgurati l-ispeċifità, ir-reqqa, il-preċiżjoni u r-riproducibilità tat-teknika analitika speċifika għas-sustanza, kif ukoll l-irkupri tas-sustanza tat-test kemm mill-ikel kif ukoll mill-hut.

Kejl tat-tkabbir tal-hut

Fil-bidu tat-test, irid jintiżen kampjun ta' hut mill-popolazzjoni tal-istokk (u jitkejjel it-tul totali ta' dawn). Dan il-hut għandu jiġi kampjunat ftit qabel l-ewwel tagħlif miżjud (eż. siegħa), u jiġi assenjat għall-jum 0 tal-esperiment. In-numru ta' hut għal dan il-kampjun għandu jkun tal-inqas l-istess bħal dak għall-kampjuni matul it-test. Uħud minn dawn jistgħu jkunu l-istess hutiet użati għall-analizi lipida qabel ma tibda l-fazi ta' tehid (ara l-paragrafu 153). F'kull intervall tal-kampjunar, il-hut l-ewwel jintiżen u jitkejjel it-tul tiegħu. F'kull huta individwali, il-piż imkejjel (u t-tul) għandu jkun marbut mal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika analizzata (u l-kontenut lipidu, jekk applikabbli), pereżempju bl-użu ta' kodiċi identifikatur uniku għal kull huta fil-kampjun. Il-kejliet tal-hut kampjunat jistgħu jintużaw sabiex jiġu stmati l-piż (u t-tul) tal-hut li jifdal fit-tankijiet tat-test u tal-kontroll.

Evalwazzjoni tal-Esperiment

Kuljum għandhom isiru u jiġu rreġistrati osservazzjonijiet tal-mortalità. Għandhom isiru osservazzjonijiet oħrajn għal effetti avversi, pereżempju għal imġiba jew pigmentazzjoni anormali, u dawn għandhom jiġu rreġistrati. Il-hut jitqies mejjet jekk ma jkun hemm ebda ċaqliq respiratorju u ma tiġi individwata ebda reazzjoni għal stimolu mekkaniku hafif. Kwalunkwe hut mejjet jew fi stat moribond ċar għandu jitneħħa.

▼ M7

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

Ir-riżultati tat-test jintużaw sabiex jinkiseb il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2) bħala funzjoni tal-piż niedi totali tal-hut. Jiġi kkalkolat il-kostant tar-rata ta' tkabbir, k_g , ibbażat fuq iż-żieda medja fil-piż tal-hut, u dan jintuża sabiex jiġi prodott il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir, k_{2g} , jekk xieraq. Barra minn hekk, għandhom ikunu rrapportati l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (a ; assorbiment mill-imsaren), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kinetika (BMF_K) (jekk ikun hemm bżonn ikkoreġut għat-tkabbir, BMF_{K_g}), il-valur ikkoreġut għal-lipidu tiegħu (BMF_{K_L} jew $BMF_{K_{g_L}}$, jekk ikkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir) u r-rata tat-tagħlif. Barra minn hekk, jekk tista' ssir stima tal-hin għall-istat stazzjonarju fil-fażi ta' tehid (eż. 95 % tal-istat stazzjonarju jew $t_{95} = 3.0/k_2$), stima tal- BMF fi stat stazzjonarju (BMF_{SS}) tista' tkun inklusa (ara l-paragrafi 105 u 106, u l-Appendiċi 5) jekk il-valur t_{95} jindika li jista' jkun li ntlahqu l-kundizzjonijiet tal-istat stazzjonarju. Għandha tiġi applikata l-istess korrezzjoni tal-lipidu għal dan il- BMF_{SS} bħalma tiġi applikata għall- BMF derivat kinetikament (BMF_K) sabiex jinhareġ valur ikkoreġut għal-lipidu, BMF_{SSL} (kun af li ma hemm ebda proċedura miftiehma disponibbli sabiex jiġi kkoreġut BMF fi stat stazzjonarju għad-dilwizzjoni tat-tkabbir). Il-formuli u l-kalkoli eżempji huma ppreżentati fl-Appendiċi 7. Hemm approċċi disponibbli li jagħmluha possibbli li jiġi smat fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) minn dejta ġġenerata fl-istudju djetetiku. Dan huwa diskuss fl-Appendiċi 8.

Dejta dwar il-piż/it-tul tal-hut

Il-piżijiet niedja u t-tul tal-hut individwali għall-perjodi ta' żmien kollha jitqiegħdu f'tabella b'mod separat għall-gruppi tat-test u tal-kontroll għall-jiem tal-kampjunar kollha matul il-fażi ta' tehid (il-popolazzjoni tal-istokk għall-bidu tat-tehid; il-grupp tal-kontroll u l-grupp tat-test għal tmiem it-tehid u, jekk issir, il-fażi bikrija (eż. jum 1-3 tat-tehid) u l-fażi ta' tisfija (eż. il-jiem 1, 2, 4, 7, 14, 28, għall-grupp tal-kontroll u l-grupp tat-test). Il-piż huwa l-kejl ippreferut tat-tkabbir għall-finijiet ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir. Ara hawn taht (paragrafi 162 u 163) u l-Appendiċi 5 għall-metodu/i użat sabiex id-dejta tiġi kkoreġuta għad-dilwizzjoni tat-tkabbir.

Dejta dwar il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut

Il-kejljet tar-residwu fit-test tal-hut individwali (jew kampjuni tal-hut raggruppati jekk ma jkunx possibbli kejljet tal-hut individwali), mogħtijin f'termini tal-konċentrazzjoni tal-piż niedi (w/w), jitqiegħdu f'tabella għall-hut tal-kontroll u tat-test għal hinijiet tal-kampjunar individwali. Jekk saret analiżi tal-lipidu fuq kull huta fil-kampjun, jistgħu jinkisbu u jiddaħħlu f'tabella l-konċentrazzjonijiet individwali kkoreġuti għal-lipidu, f'termini tal-konċentrazzjoni tal-lipidu (lipidu w/w).

— Il-kejljet tar-residwu tas-sustanza tat-test f'hut individwali (jew kampjuni tal-hut raggruppati jekk ma jkunx possibbli li jsiru kejljet tal-hut individwali, ara l-paragrafu 66) għall-perjodu ta' tisfija jiġu kkonvertiti fil-logaritmi naturali tagħhom u jiġu plottjati kontra z-żmien (jum). Jekk spezzjoni viżiva tal-plott turi eċċezzjonijiet ovvj, jista' jiġi applikat test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu sabiex jitnehhew punti ta' dejta spurji kif ukoll tingħata ġustifikazzjoni dokumentata għaliex tnehhew.

— Korrelazzjoni tal-inqas kaxex lineari tiġi kkalkolata għad-dejta dwar $\ln(\text{konċentrazzjoni})$ vs. tisfija (jum). Il-pendil u l-interċetta tal-linja jiġu rrapportati bħala l-kostant totali tar-rata ta' tisfija (k_2) u l-logaritma naturali tal-konċentrazzjoni derivata fiz-żmien zero ($C_{0,d}$) (ara l-Appendiċi 5 u l-Appendiċi 7 għal iktar dettalji). Jekk dan ma jkunx possibbli għaliex il-konċentrazzjonijiet jaqgħu taht il-limitu tal-kwantifikazzjoni għat-tieni kampjun ta' tisfija, tista' ssir stima konservattiva tal- k_2 (ara l-Appendiċi 7).

— Il-varjanzi fil-pendil u l-interċetta tal-linja huma kkalkolati bl-użu tal-proċeduri statistiċi standard u l-intervalli ta' kunfidenza ta' 90 % (jew 95 %) madwar dawn ir-riżultati jiġu evalwati u ppreżentati.

▼ M7

- Il-konċentrazzjoni medja mkejla fil-ħut għall-jum finali tat-tehid (il-konċentrazzjoni fiż-żmien zero mkejla, $C_{0,m}$) tiġi kkalkolata wkoll u titqabbel mal-valur derivat $C_{0,d}$. F'każ li l-valur derivat ikun inqas mill-valur imkejjel, id-differenza tista' tissuggerixxi l-preżenza ta' ikel miżjud mhux iddigerit fl-imsaren. Jekk il-valur derivat ikun ferm oghla mill-valur imkejjel, dan jista' jkun indikazzjoni li l-valur derivat mir-rigressjoni lineari tad-dejta dwar it-tisfija huwa żbaljat u għandu jerga' jiġi evalwat (ara l-Appendiċi 7).

Rata ta' tisfija u fattur ta' bijomanjifikazzjoni

Sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni mid-dejta, l-ewwel għandha tinkiseb l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (adsorbiment tas-sustanza tat-test fl-imsaren, α). Sabiex isir hekk, għandha tintuża l-ekwazzjoni A7.1 fl-Appendiċi 7, li tehtieg li jkunu magħrufin il-konċentrazzjoni derivata fil-ħut fiż-żmien zero tal-faży ta' tisfija ($C_{0,d}$), il-kostant (totali) tar-rata ta' tisfija (k_2), il-konċentrazzjoni fl-ikel (C_{food}), il-kostant tar-rata ta' ingestjoni tal-ikel (I) u d-durata tal-perjodu ta' tehid (t). Il-pendil u l-interċetta tar-relazzjoni lineari bejn $\ln(\text{konċentrazzjoni})$ u l-ħin ta' tisfija jiġu rrapportati bħala l-kostant totali tar-rata ta' tisfija ($k_2 = \text{pendil}$) u l-konċentrazzjoni fiż-żmien zero ($C_{0,d} = e_{\text{interċetta}}$), kif spjegat hawn fuq. Il-valuri derivati għandhom jiġu vverifikati għall-plawżibbiltà bijoloġika (eż. l-effiċjenza tal-assimilazzjoni bħala frazzjoni mhijiex ikbar minn 1). (I) hija kkalkolata bid-diviżjoni tal-massa tal-ikel bil-massa tal-ħut magħlef kuljum (jekk jingħata ikel li jiżen 2 % tal-piż tal-ġisem, (I) sejjer ikun 0.02). Madankollu, ir-rata ta' tagħlif uzata fil-kalkolu ja' ikollha bżonn tiġi aġġustata għat-tkabbir tal-ħut (dan jista' jsir bl-użu tal-kostant magħruf tar-rata ta' tkabbir sabiex jiġi stmat il-piż tal-ħut f'kull punt ta' żmien matul il-faży ta' tehid; ara l-Appendiċi 7). F'każijiet li fihom ma jistgħux jinkisbu k_2 and $C_{0,d}$ għaliex, pereżempju, il-konċentrazzjonijiet waqgħu taht il-limitu ta' detezzjoni għat-tieni kampjun ta' tisfija, jistgħu jsiru stima konservattiva ta' k_2 u BMF_k "ta' livell superjuri" (ara l-Appendiċi 7).

Ladarba tinkiseb l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (α), il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni jista' jiġi kkalkolat billi α tiġi multiplikata bil-kostant tar-rata ta' ingestjoni (I) u bid-diviżjoni bil-kostant (totali) tar-rata ta' tisfija (k_2). Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għat-tkabbir huwa kkalkolat bl-istess mod iżda bl-użu tal-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g} ; ara l-paragrafi 162 u 163. Stima alternattiva tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni tista' tinkiseb jekk l-analiżi tat-tessut saret fuq ħut kampjunat fil-faży lineari bikrija tal-faży ta' tehid; ara l-paragrafu 151 u l-Appendiċi 7. Dan il-valur jirrappreżenta stima indipendenti tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni għal organizzmu essenzjalment mhux espost (jiġifieri l-ħut huwa qrib il-bidu tal-faży ta' tehid). L-effiċjenza tal-assimilazzjoni stmata mid-dejta ta' tisfija normalment tintuża sabiex jinkiseb il-BMF.

Korrezzjoni għal-Lipidu u Korrezzjoni tad-Dilwizzjoni tat-Tkabbir

It-tkabbir tal-ħut matul il-faży ta' tisfija jista' jibaxxi l-konċentrazzjonijiet kimiċi mkejlin fil-ħut bl-effett li l-kostant totali tar-rata ta' tisfija, k_2 , ikun ikbar minn dak li jirriżulta minn proċessi ta' tneħħija (eż. metabolizmu, eġestjoni) wahedhom (ara l-paragrafu 72). Il-kontenuti lipidi tal-ħut tat-test (li huma ferm assoċjati mal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi idrofobiċi) u kontenuti lipidi tal-ikel jistgħu jvarjaw biżżejjed fil-prattika tant li jkun hemm bżonn li jiġu kkoreġuti sabiex il-fatturi ta' bijomanjifikazzjoni jkunu ppreżentati b'mod sinifikanti. Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni għandu jiġi kkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir (bħall-BCF kinetiku fil-metodu tal-esponiment milwiem) u jiġi kkoreġut għall-kontenut lipidu tal-ikel marbut ma' dak tal-ħut (il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu). L-ekwazzjonijiet u l-eżempji għal dawn il-kalkoli jistgħu jinkisbu fl-Appendiċi 5 u l-Appendiċi 7, rispettivament.

Sabiex issir korrezzjoni għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, għandu jiġi kkalkolat il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g}) (ara l-Appendiċi 5 għall-ekwazzjonijiet). Imbagħad, dan il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (k_{2g}) jintuża sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għat-tkabbir, bħal fil-paragrafu 73. F'ċerti każijiet dan l-approċċ ma jkunx possibbli. Approċċ alternattiv li jevita l-htiega ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir jinvolvi l-użu ta' dejta dwar it-tisfija tal-massa tas-sustanza tat-test għal kull

▼ **M7**

ħuta (fuq il-baži tal-ħuta shiħa) minflok id-dejta tas-soltu dwar il-massa tas-sustanza tat-test għal kull unità tal-massa tal-ħut (konċentrazzjoni). Dan jista' jinkiseb faċilment peress li t-testijiet skont dan il-metodu għandhom jorbtu l-konċentrazzjonijiet tat-tessut irreġistrati mal-piżijiet tal-ħut individwali. Il-proċedura sempliċi għal dan hija spjegata fl-Appendiċi 5. Kun af li l- k_2 xorta waħda għandu jiġi smat u rrapportat, anki jekk jintuża dan l-approċċ.

Sabiex issir korrezzjoni għall-kontenut lipidu tal-ikel u l-ħut meta l-analiżi tal-lipidu ma tkunx saret fuq il-ħut kollu fil-kampjun, jinkisbu l-frazzjonijiet lipidi medji (w/w) fil-ħut u fl-ikel⁽¹⁾. Imbagħad jiġi kkalkolat il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu (L_c) bid-diviżjoni tal-frazzjoni tal-lipidu medju fil-ħut bil-frazzjoni tal-lipidu medju fl-ikel. Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni, ikkoreġut għat-tkabbir jew le skont kif ikun applikabbli, jiġi diviż bil-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għal-lipidu.

Jekk l-analiżijiet kimiċi u lipidi saru fuq l-istess ħut fl-istess punt tal-kampjunar, tista' tintuża d-dejta dwar it-tessut ikkoreġut għal-lipidu għal ħut individwali sabiex jiġi kkalkolat BMF ikkoreġut għal-lipidu direttament (ara (37)). Il-plott tad-dejta dwar il-konċentrazzjoni kkoreġuta għal-lipidu jagħti $C_{0,d}$ fuq baži lipida u k_2 . Imbagħad, l-analiżi matematika tista' tkompli bl-użu tal-istess ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 7, iżda l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (a) tiġi kkalkolata bl-użu tal-kostant tar-rata ta' ingestjoni tal-ikel normalizzata għal-lipidu (I_{lipidu}) u l-konċentrazzjoni djetetika fuq baži lipida ($C_{ikel-lipidu}$). Imbagħad, il-parametri kkoreġuti għal-lipidu jintużaw b'mod simili sabiex jiġi kkalkolat il-BMF (kun af li l-korrezzjoni tal-kostant tar-rata ta' tkabbir għandha tiġi applikata wkoll għall-frazzjoni tal-lipidu minflok il-piż niedi tal-ħut sabiex jiġi kkalkolat il-BMF_{K_{EL}} ikkoreġut għat-tkabbir u kkoreġut għal-lipidu).

Interpretazzjoni tar-riżultati

Fil-prinċipju, it-tkabbir medju fil-grupp tat-test kif ukoll f'tal-kontroll ma għandux ikun wisq differenti sabiex jiġu esklużi l-effetti tossiċi. Il-kostanti tar-rata ta' tkabbir jew il-kurvi tat-tkabbir taż-żewġ gruppi għandhom jittqabblu permezz ta' proċedura xierqa⁽²⁾.

Rapport tat-test

Wara li jintemm l-istudju, jithejja rapport finali li jkun fih l-informazzjoni dwar *is-Sustanza tat-Test*, *l-Ispeċi tat-Test* u *l-Kundizzjonijiet tat-Test* kif elenkata fil-paragrafu 81 (bħal fil-każ tal-metodu tal-esponiment milwiem). Barra minn hekk, hija meħtieġa l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

— Kwalunkwe informazzjoni dwar l-istabilità tas-sustanza fl-ikel imhejji;

⁽¹⁾ Dan l-approċċ huwa speċifiku għall-istudju djetetiku, differenti mill-proċedura segwita fl-esponiment milwiem, u b'hekk intużat il-kelma "korrezzjoni" minflok "normalizzazzjoni" sabiex tiġi evitata konfużjoni — ara wkoll in-nota fqiegħ il-paġna (106).

⁽²⁾ Jista' jsir test- t fuq il-kostanti tar-rata ta' tkabbir, sabiex jiġi ttestjat dwar jekk it-tkabbir ivarjax bejn il-grupp tal-kontroll u dak tat-test, jew test- F fil-każ ta' analiżi tal-varjanza. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jintuża test tal-proporzjon ta' probabilità jew test- F sabiex jgħin fl-għażla tal-mudell tat-tkabbir xieraq (monograff 54 tal-OECD, (32).

▼ **M7***Kundizzjonijiet tat-test:*

- Il-konċentrazzjoni nominali tas-sustanza fl-ikel, it-teknika ta' kif tiżdied is-sustanza, l-ammont ta' veikolu (lipidu) użat fil-proċess ta' zieda tas-sustanza fl-ikel (jekk jintuża), il-kejl tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dieta miżjuda bis-sustanza għal kull analiżi (tal-inqas fi triplikat qabel il-bidu tal-istudju u tmiem it-tehid) u l-valuri medji;
- Jekk jintuża, it-tip u l-kwalità taż-żejt trasportatur jew is-solvent (grad, fornitur, eċċ.) użat għaž-zieda tas-sustanza mal-ikel;
- It-tip ta' ikel użat (analiżi prossima ⁽¹⁾, grad jew kwalità, fornitur, eċċ.), ir-rata tat-tagħlif matul il-fażi ta' tehid, l-ammont ta' ikel mogħti u l-frekwenza (inkluż kwalunkwe aġġustament fuq il-bażi tal-piż tal-ħut fil-kampjun);
- Il-ħin li fih ingabar u li fih ġie ewtanizzat il-ħut għall-analiżi kimika għal kull punt tal-kampjunar (eż. siegħa qabel it-tagħlif tal-ġurnata li jmiss);

Ir-riżultati:

- Ir-riżultati minn kwalunkwe hidma ta' studju preliminari;
- Informazzjoni dwar kwalunkwe effett avvers osservat.
- Deskrizzjoni sħiħa tal-proċeduri ta' analiżi kimika kollha mhaddmin inkluzi l-limiti ta' detezzjoni u l-kwantifikazzjoni, il-varjabbiltà u l-irkupru.
- Il-konċentrazzjonijiet ta' lipidu mkejlin fl-ikel (dieta miżjuda u tal-kontroll), il-valuri individwali, medji u d-devjazzjonijiet standard;
- Dejta f'tabella tal-piż (u t-tul) tal-ħut, b'rabta mal-ħut individwali, kemm għall-gruppi tal-kontroll u tal-esponiment (pereżempju bl-użu ta' identifikaturi uniċi għal kull ħuta) u kalkoli, il-kostant(i) tar-rata ta' tkabbir derivat u intervall(i) ta' kunfidenza ta' 95 %;
- Id-dejta f'tabella dwar il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut, il-konċentrazzjoni medja mkejla fi tmiem it-tehid ($C_{0,m}$), u l-kostant (totali) derivat tar-rata ta' tisfija (k_2) u l-konċentrazzjoni fil-ħut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija ($C_{0,d}$) flimkien mal-varjanzi f'dawn il-valuri (pendil u interċetta);
- Id-dejta f'tabella dwar il-kontenuti ta' lipidu fil-ħut (elenkata kontra l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza speċifiċi, jekk applikabbli), il-valuri medji għall-grupp tat-test u l-kontroll fil-bidu tat-test, tmiem it-tehid u tmiem it-tisfija;
- Il-kurvi (inkluża d-dejta mkejla kollha), li juru dan li ġej (jekk applikabbli, il-konċentrazzjonijiet jistgħu jiġu espressi b'rabta mal-ġisem sħiħ tal-animall jew tessuti speċifiċi tiegħu):
 - it-tkabbir (jiġifieri l-piż tal-ħut (u t-tul) vs il-ħin) jew il-piż trasformat tal-logaritma naturali vs il-ħin;

⁽¹⁾ Teknika ta' analiżi tal-oġġetti tal-ikel għall-kontenut ta' proteina, lipidu, fibra mhux raffinata u rmied; din l-informazzjoni normalment tkun disponibbli mingħand il-fornitur tal-ġhalf.

▼ **M7**

- it-tisfija tas-sustanza tat-test fil-ħut; u
- il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali (l'konċentrazzjoni) vs il-ħin tat-tisfija (inkluz il-kostant tar-rata ta' tisfija derivat k_2 , u l-konċentrazzjoni derivata tal-logaritma naturali fil-ħut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija, $C_{0,d}$).
- Jekk spezzjoni viżiva ta' plott turi eċċezzjonijiet ovvj, jista' jiġi applikat test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu sabiex jitnehhew punti ta' dejta spurji kif ukoll tinghata ġustifikazzjoni dokumentata għaliex tnehhew.
- Il-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat- k_{tkabbir} u n-nofs ħajja kkoreġuta għat- k_{tkabbir} ikkalkolati.
- L-effiċjenza tal-assimilazzjoni (α) ikkalkolata.
- BMF djetetiku “mhux raffinat” BMF kinetiku kkoreġut għad-dilwizzjoni tat- k_{tkabbir} u l-lipidu (“mhux raffinat” u kkoreġut għal-lipidu fuq il-bażi tal-piż niedi tal-ħut shih), il-BMF speċifiku għat-tessut jekk applikabbli.
- Kwalunkwe informazzjoni li tikkonċerna metaboliti radjotikkettati tas-sustanza tat-test u l-akkumulazzjoni tagħhom.
- Kwalunkwe haġa li mhijiex tas-soltu dwar it-test, kwalunkwe devjazzjoni minn dawn il-proċeduri, u kwalunkwe informazzjoni rilevanti oħra.
- Tabella li tiġbor id-dejta mkejla u kkalkolata rilevanti, kif spjegat hawn;

Kostanti tar-Rata ta' Tisfija tas-Sustanza u Fatturi ta' Bijomanjifikazzjoni (BMF _K)	
k_g (kostant tar-rata ta' k_{tkabbir} ; jum^{-1}):	Dahħal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (kostant totali tar-rata tat-tisfija, jum):	Dahħal Valur (95 % CI)
k_{2g} (kostant tar-rata ta' tisfija korrett għat- k_{tkabbir} ; jum^{-1}):	Dahħal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (konċentrazzjoni mkejla fiż- żmien zero, il-konċentrazzjoni fil- ħut fi tmiem it-teħid) ($\mu\text{g/g}$):	Dahħal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (konċentrazzjoni fiż-żmien zero derivata tal-fażi ta' tisfija; $\mu\text{g/g}$):	Dahħal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
I (rata ta' inġestjoni tal-ghalf stabbi- lita; g ikel/g ħut/ jum):	Dahħal Valur
I_g (rata ta' tagħlif effettiva, aġġustata għat- k_{tkabbir} ; g ikel/g ħut/ jum) ⁽²⁾ :	Dahħal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
C_{food} (konċentrazzjoni kimika fl-ikel; $\mu\text{g/g}$):	Dahħal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
α (effiċjenza tal-assimilazzjoni tas- sustanza):	Dahħal Valur $\pm$ SD ⁽²⁾
BMF _K (BMF djetetiku kinetiku):	Dahħal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾
BMF _{Kg} (BMF djetetiku kinetiku kkoreġut għat- k_{tkabbir}):	Dahħal Valur (95 % CI) ⁽¹⁾

▼ **M7**

Kostanti tar-Rata ta' Tisfija tas-Sustanza u Fatturi ta' Bijomanjifikazzjoni (BMF _K)	
$t_{1/2g}$ (nofs ħajja kkoreġuta għat-tkabbir f'jiem);	Dahħal Valur ± SD ⁽²⁾
L _c (fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu):	Dahħal Valur
BMF _{K_gL} (BMF kinetiku kkoreġut għat-tkabbir u kkoreġut għal-lipidu):	Dahħal Valur
BMF _{SS-L} (BMF indikattiv fi stat stazzjonarju kkoreġut għal-lipidu) ⁽²⁾ :	Dahħal Valur ± SD ⁽²⁾
⁽¹⁾ CI: intervall ta' kunfidenza (fejn ikun possibbli li jiġi stmat)	
⁽²⁾ SD: Devjazzjoni standard (fejn ikun possibbli li tiġi stmata)	

TAGHRIF

- (1) Chapter C.13 of this Annex, *Bioconcentration: Flow-through Fish Test*.
- (2) Chapter A.6 of this Annex, *Water Solubility*.
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) Chapter A.8 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*.
- (5) Chapter A.24 of this Annex, *Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method*.
- (6) Chapter A.23 of this Annex, *Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method*.
- (7) Chapter C.7 of this Annex, *Hydrolysis as a Function of pH*.
- (8) OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water [OCDE/GD\(97\)21](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (9) Chapter A.5 of this Annex, *Surface Tension of Aqueous Solutions*.
- (10) Chapter A.4 of this Annex, *Vapour Pressure*.
- (11) Chapter C.4 of this Annex, *Ready Biodegradability*.
- (12) Chapter C.29 of this Annex, *Ready Biodegradability — CO₂ in sealed vessels*
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klammer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2', 5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliehdner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.
- (22) Chapter C.47 of this Annex, *Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*.
- (23) Chapter C.15 of this Annex, *Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*
- (24) Chapter C.14 of this Annex, *Fish, Juvenile Growth Test*.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures [ENV/JM/MONO\(2000\)6](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micro-method for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. [ENV/JM/MONO\(2006\)18](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼ **M7**

- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijnbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere*. 14: 829-833.
- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼ M7

- (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718-1728.
- (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET**

L-effiċjenza tal-assimilazzjoni (α) hija kejl tal-ammont relattiv tas-sustanza assorbita mill-imsaren fl-organizmu (α hija minghajr unità, iżda spiss tinghata bħala perċentwal iktar milli frazzjoni).

Ġeneralment il-bijoakkumulazzjoni tissejjah proċess li fih il-konċentrazzjoni tas-sustanza f'organizmu tilhaq livell li jaqbeż dak fil-medium respiratorju (eż. l-ilma għal huta jew l-arja għal mammiferu), id-dieta, jew it-tnejn (1).

Il-bijokonċentrazzjoni hija ż-zieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test go jew fuq organismu (jew tessuti speċifiċi tiegħu) relatata mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-medium li jiċċirkundaha.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni (BCF jew K_B) fi kwalunkwe hin matul il-fażi ta' teħid ta' dan it-test tal-akkumulazzjoni hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test go/fuq il-hut jew it-tessuti speċifiċi tiegħu (C_f bħala mg/kg) diviża bil-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-mezz li jiċċirkundaha (C_w bħala mg/l). BCF huwa espress f'l·kg⁻¹. Jekk jogħġbok kun af li l-korrezzjonijiet għat-tkabbir u/jew il-kontenut lipidu standard mhumix meqjusin.

Il-bijomanjifikazzjoni hija ż-zieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test go jew fuq organismu (jew tessuti speċifiċi tiegħu) relatata mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel.

Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni (BMF) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza fi predatur b'rabta mal-konċentrazzjoni fil-priża (jew l-ikel) tal-predatur fi stat stazzjonarju. Fil-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar, l-esponiment permezz tal-fażi milwiema jiġi evitat bir-reqqa u, b'hekk, valur tal-BMF minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jitqabbel direttament ma' valur tal-BMF minn studju Prattiku (li fih jistgħu jiġu kombinati l-esponiment mill-ilma kif ukoll l-esponiment djetetiku).

Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni djetetika (BMF djetetiku) huwa t-terminu użat f'dan il-metodu ta' ttestjar sabiex jiġi deskritt ir-riżultat tat-test ta' esponiment djetetiku, li fih l-esponiment permezz tal-fażi milwiema jiġi evitat bir-reqqa u, b'hekk, il-BMF djetetiku minn dan il-metodu ta' ttestjar ma jistax jitqabbel direttament ma' valur tal-BMF minn studju Prattiku (li fih jistgħu jiġu kombinati l-esponiment mill-ilma kif ukoll l-esponiment djetetiku).

Il-fāzi ta' tisfija jew ta' wara l-esponiment (telf) hija l-hin, wara t-trasferiment tal-hut tat-test minn medium li fih is-sustanza tat-test għal medium liberu ta' dik is-sustanza, li matulu tiġi studjata t-tisfija (jew it-telf nett) tas-sustanza mill-hut tat-test (jew tessut speċifiku tiegħu).

Il-kostant tar-rata ta' tisfija (telf) (k_2) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut tat-test (jew tessuti speċifiċi tiegħu) wara t-trasferiment tal-hut tat-test minn medium li fih is-sustanza tat-test għal medium liberu ta' dik is-sustanza (k_2 huwa espress f'jum⁻¹).

Il-karbonju organiku dissolt (DOC) huwa kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbonju li jorigina minn sorsi organiċi dissolti fil-media tat-test.

Il-fāzi tal-esponiment jew ta' teħid hija ż-żmien li matulu l-hut jiġu esposti għas-sustanza tat-test.

Il-rata ta' ingestjoni tal-ikel (I) hija l-ammont medju ta' ikel meħud minn kull huta kuljum, b'rabta mal-piż medju stmat tal-ġisem tal-hut shih (espress f'termini ta' g ikel/g hut/jum).

▼ M7

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) huwa l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' teħid, k_1 , għall-kostant tar-rata ta' tisfija, k_2 (jiġifieri k_1/k_2 — ara d-definizzjonijiet korrispondenti f'dan l-Appendiċi). Fil-prinċipju, il-valur għandu jkun komparabbli mal- BCF_{SS} (ara d-definizzjoni iktar 'il fuq), iżda jista' jkun hemm devjazzjonijiet jekk l-istat stazzjonarju kien inċert jew jekk ġew applikati korrezzjonijiet għat-tkabbir għall-BCF kinetiku.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika normalizzat għal-lipidu (BCF_{KL}) huwa normalizzat għal huta b'kontenut lipidu ta' 5 %.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika kkoreġut għat-tkabbir normalizzat għal-lipidu (BCF_{KGL}) huwa normalizzat għal huta b'kontenut lipidu ta' 5 % u kkoreġut għat-tkabbir matul il-perjodu ta' studju kif spjegat fl-Appendiċi 5.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju normalizzat għal-lipidu (BCF_{SSL}) huwa normalizzat għal huta b'kontenut lipidu ta' 5 %.

Sustanza multikostitwenti hija definita għall-fini tar-REACH bħala sustanza li għandha iktar minn kostitwent ewlieni wieħed prezenti f'konċentrazzjoni ta' bejn 10 % u 80 % (w/w).

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (K_{OW}) huwa l-proporzjon tas-solubilità ta' sustanza f'*n*-ottanol u ilma f'ekwilibriju (Metodi A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); espress ukoll bħala P_{OW} . Il-logaritmu ta' K_{OW} tintuża bħala indikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza għal bijokonċentrazzjoni minn organiżmi akwatiċi.

Il-karbonju organiku partikulat (POC) huwa kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbonju li joriġina minn sorsi organiċi sospizi fil-media tat-test.

Il-mikroestrazzjoni tal-fażi solida (SPME) hija teknika analitika mingħajr solvent żviluppata għal sistemi dilwiti. F'dan il-metodu, fibra miksiya b'polimeru tiġi esposta għall-fażi gassuża jew likwida li fiha l-analit ta' interess. Generalment, jiġi impost żmien miminu tal-analizi sabiex jiġu stabbiliti kundizzjonijiet ta' ekwilibriju bejn il-fażijiet solidi u fluwidi, fir-rigward tal-ispeċi mkejla. Imbagħad, tkun tista' tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tal-analit ta' interess direttament mill-fibra jew wara li tiġi estratta mill-fibra f'solvent, skont it-teknika ta' determinazzjoni.

Stat stazzjonarju jintlaħaq fil-plott tas-sustanza tat-test fil-hut (C_f) kontra l-hin meta l-kurva ssir parallela għall-assi tal-hin u tlett analizijiet suċċessivi tas- C_f magħmula fuq kampjuni meħuda fl-intervalli ta' mill-inqas jumejn huma fi hdan ± 20 % minn xulxin, u ma hemmx żieda sinifikanti ta' C_f fil-hin bejn l-ewwel u l-aħħar analizi suċċessivi. Meta jiġu analizzati l-kampjuni miġbura flimkien, hemm bżonn ta' mill-inqas erba' analizijiet suċċessivi. Għas-sustanzi tat-test li jittieħdu bil-mod, ikun aktar xieraq li l-intervalli jkunu ta' sebat ijiem.

Il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) ma jinbidilx b'mod sinifikanti tul perjodu mġedded ta' żmien, bil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-medium li jiċċirkundaha li tibqa' kostanti tul dan il-perjodu ta' żmien (ara d-Definizzjoni ta' stat stazzjonarju).

Il-karbonju organiku totali (TOC) huwa kejl tal-konċentrazzjoni tal-karbonju li joriġina mis-sorsi organiċi kollha fil-media tat-test, inklużi sorsi partikulati u dissolti.

Il-kostant tar-rata ta' teħid (k_1) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'hut tat-test jew fuqu (jew tessuti speċifiċi tiegħu) meta l-hut ikun espost għal dik is-sustanza (k_1 huwa espress fl $\text{kg}^{-1} \text{jum}^{-1}$).

Sustanzi b'kompożizzjoni Mhux Magħrufa jew Varjabbli, Prodotti ta' reazzjoni kumplessa u Materjali bijoloġiċi huma magħrufin bħala UVCB

▼M7

Sustanza kimika hija sustanza jew tahlita.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

TAGHRIF

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.
- (2) Il-Kapitolu A.8 ta' dan l-Anness, *Koeffiċjent ta' Partizzjoni (n-ottanol/ilma): Metodu tat-Thawwid tal-Flask*
- (3) Il-Kapitolu A.24 ta' dan l-Anness, *Koeffiċjent ta' Partizzjoni (n-ottanol/ilma), Metodu HPLC*.
- (4) Il-Kapitolu A.23 ta' dan l-Anness, *Koeffiċjent ta' Partizzjoni (1-Ottanol/ilma): Metodu ta' Thawwid bil-Mod*.

▼ **M7***Appendiċi 2***ĊERTI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TA' DILWIZZJONI
AĊĊETTABBLI**

Komponent	Konċentrazzjonijiet limitu
Materja partikolata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organoklorurati totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Hadid	1 µg/l
Ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

▼ M7

Appendiċi 3

SPEĊIJJET TA' HUT RAKKOMANDATI GHALL-ITTESTJAR

Speċijiet rakkomandati	Medda rakkomandata għat-temperatura tat-test (°C)	It-tul totali rakkomandat tal-annimal tat-test (cm) (²)
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Żebra	20 – 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Karpjun buras	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpjun komuni	20 – 25	8,0 ± 4,0 ⁽³⁾
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Medaka	20 – 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Gapi	20 – 25	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Dott tal-misluta blu	20 – 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Trota qawsalla	13 – 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Spinarell	18 – 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer *et al.* (1)

⁽²⁾ Ta' min jghid li fit-test innifsu, il-piz huwa ppreferut bhala l-kejl għad-derivazzjonijiet tad-daqs u tal-kostant tar-rata ta' tkabbir. Madankollu, huwa rikonoxxut li t-tul huwa kejl iktar prattiku jekk il-hut irid jingħażel fuq l-għajnejn fil-bidu ta' esperiment (jigifieri mill-popolazzjoni tal-istokk).

⁽³⁾ Din il-medda ta' tul hija indikata fil-Metodi ta' Ttestjar għal Sustanzi Kimiċi Godda eċċ. fuq il-bażi tal-Liġi tal-Gappun dwar il-Kontroll tas-Sustanzi Kimiċi (CSCL).

Hemm diversi speċijiet tal-ilma salmura u marittimi li ntużaw inqas spiss, pereżempju:

Taqtuqa tat-tebgha	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Karpjun tas-snien varjegati	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Menidja tal-marea	(<i>Menidia beryllina</i>)
Dott fiddien	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Barbun Inġliż	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Skorfna korazzata	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Spinarell	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Spnotta	(<i>Dicentracus labrax</i>)
Karpjun ta' Al Bura	(<i>Alburnus alburnus</i>)

▼ **M7**

Il-ħut tal-ilma ħelu mnizzel fit-tabella ta' hawn fuq huwa faċli biex jittrabba u/jew jinstab b'mod komuni matul is-sena, filwaqt li d-disponibbiltà tal-ispeċijiet marittimi u tal-ilma salmura huwa parzjalment limitat għall-pajjiżi rispettivi. Huwa kapaċi jittrabba u jiġi kkultivat f'farms tal-ħut jew fil-laboratorju, f'kundizzjonijiet ikkontrollati għal kontra l-mard u l-parasiti, sabiex l-annimal tat-test ikun b'saħħtu u b'parentela magħrufa. Dan il-ħut huwa disponibbli f'bosta bnadi tad-dinja.

TAGHRIF

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼ M7

Appendiċi 4

**SKEDI TAL-KAMPJUNAR GHAL TESTIJET TAL-ESPONIMENT
MILWIEM U DJETETIKU**

**1. Eżempju teoriku ta' skeda tal-kampjunar ghal test shih tal-bijokonċen-
trazzjoni b'esoniment milwiem ta' sustanza b'log K_{OW} = 4.**

Kampjunar tal-Hut	Skeda tal-hin tal-kampjun		Nru ta' kampjuni tal-ilma ⁽¹⁾	Nru ta' hut ghal kull kampjun ⁽¹⁾
	Frekwenza minima mehtieġa (jiem) ⁽²⁾	Kampjunar addizzjonali (jiem) ⁽²⁾		
Fazi ta' Tehid				
1	– 1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		(2)	(3 ⁽⁶⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁶⁾)
Fazi ta' tisfija				Trasferiment tal-hut f'ilma hieles mis-sustanza tat-test
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4 + 3 ⁽⁶⁾)
TOTAL				40 – 72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Il-valuri fil-parentesi huma numri ta' kampjuni (ilma, hut) li għandhom jittiehdu jekk isir iktar kampjunar.

⁽²⁾ L-istima ta' qabel it-test tal- k_2 għal log K_{OW} ta' 4,0 hija ta' 0,652 jiem⁻¹. Id-durata totali tal-esperiment hija stabbilita għal $3 \times t_{SS} = 3 \times 4,6$ jiem, jiġifieri 14-il jum. Għall-istiam tat- t_{SS} irreferi għall-Appendiċi 5.

⁽³⁾ Tehid ta' kampjun tal-ilma wara li jiġu forniti tal-inqas 3 “volumi ta' kompartiment”.

⁽⁴⁾ Jittiehed kampjun ta' dan il-hut mill-popolazzjoni tal-istokk.

⁽⁵⁾ Jekk ikun hemm bżonn ta' preċiżjoni ikbar jew studji dwar il-metabolizmu li jehtieġu iktar hut, dawn għandhom jiġu kampjunati b'mod partikolari fi tmiem il-fażijiet ta' tehid u tisfija (ara l-paragrafu 40).

⁽⁶⁾ Jista' jkun hemm bżonn ta' tal-inqas 3 hutiet oħra għall-analizi tal-kontenut lipidu jekk ma jkunx possibbli li jintuza l-istess hut kampjunat għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza fil-bidu tat-test, tmiem il-fażi ta' tehid u tmiem il-fażi ta' tisfija. Kun af li f'hafna każijiet għandu jkun possibbli li jintużaw 3 hutiet tal-kontroll biss (ara l-paragrafu 56).

▼ M7

2. Eżempju teoriku tal-iskeda tal-kampjunar għat-test tal-bijoakkumulazzjoni djetetika tas-sustanza wara fażijiet ta' 10 ijiem tehid u 42 jum tisfija.

Okkażjoni tal-kampjunar	Skeda tal-hin tal-kampjun		Nru ta' kampjuni tal-ikel	Nru ta' hut għal kull kampjun	
	Jum tal-faži	Kampjuni addizzjonali tal-hut?		Grupp tat-Test	Grupp tal-Kontroll
Faži ta' Tehid					
1	0	Possibbli ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 — grupp tat-test	0	5 – 10
			3 — grupp tal-kontroll ⁽¹⁾		(8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 – 10	5 – 10
2	10	Iva ⁽⁴⁾	3 — grupp tat-test	10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
			3 — grupp tal-kontroll ⁽¹⁾	(13 – 18) ⁽⁵⁾	(8 – 13) ⁽⁵⁾
Faži ta' tisfija					
3	1	Iva ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
4	2			5 – 10	5 – 10
5	4			5 – 10	5 – 10
6	7	Iva ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾	5 – 10
7	14			5 – 10	5 – 10
8	28			5 – 10	5 – 10
9	42	Iva ⁽⁴⁾		10 – 15 ⁽⁴⁾ (13 – 18) ⁽⁵⁾	5 – 10 (8 – 13) ⁽⁵⁾
TOTAL				59 – 120 (63 – 126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50 – 110 (56 – 116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ 3 kampjuni ta' għalf mill-gruppi tal-kontroll u tat-test analizzati għal konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u għal kontenut lipidu.

⁽²⁾ Jittiehed kampjun tal-hut mill-popolazzjoni tal-istokk fl-iktar żmien qrib l-istudju possibbli; għandu jittiehed kampjun ta' tal-inqas 3 hutiet mill-popolazzjoni tal-istokk fil-bidu tat-test għall-kontenut lipidu.

⁽³⁾ Kampjunar (mhux obligatorju) bikri fil-faži ta' tehid jipprovi dejta sabiex tiġi kkalkolata l-assimilazzjoni djetetika tas-sustanza tat-test li tista' titqabbel mal-effiċjenza tal-assimilazzjoni kkalkolata mid-dejta tal-faži ta' tisfija.

⁽⁴⁾ Jista' jittiehed kampjun ta' 5 hutiet oħrajn għal analizi speċifika għat-tessut.

⁽⁵⁾ Jista' jkun hemm bżonn ta' tal-inqas 3 hutiet oħrajn għall-analizi tal-kontenut lipidu jekk ma jkunx possibbli li jintuża l-istess hut kampjunat għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza fil-bidu tat-test, tmiem il-faži ta' tehid u tmiem il-faži ta' tisfija. Kun af li f'hafna każijiet għandu jkun possibbli li jintużaw 3 hutiet tal-kontroll biss (ara l-paragrafi 56 u 153).

Nota dwar il-faži u ż-żmien tal-kampjunar: Il-faži ta' tehid tibda bl-ewwel tagħlif ta' ikel miżjud. Jum tal-esperiment jibda mit-tagħlif sa ftit qabel it-tagħlif li jmiss, 24 siegħa wara. L-ewwel okkażjoni ta' kampjunar (1 fit-tabella) għandha tiġi ftit qabel l-ewwel tagħlif (eż. siegħa). Il-kampjunar matul studju idealment għandu jsir ftit qabel it-tagħlif tal-ghada (jiġifieri madwar 23 siegħa wara t-tagħlif tal-jum tal-kampjunar). Il-faži ta' tehid tintemm ftit qabel l-ewwel tagħlif b'dieta mhux miżjuda, meta tibda l-faži ta' tisfija (huwa probabbli li l-hut tal-grupp tat-test ikun għadu qiegħed jiddiġerixxi għalf miżjud fl-24 siegħa ta' wara l-aħħar tagħlif ta' dieta miżjuda). Dan ifisser li l-kampjun ta' tmiem it-tehid għandu jittiehed ftit qabel l-ewwel tagħlif b'dieta mhux miżjuda u l-ewwel kampjun tal-faži ta' tisfija għandu jittiehed madwar 23 siegħa wara l-ewwel tagħlif b'għalf mhux miżjud.

▼ **M7**

Appendiċi 5

KALKOLI ĠENERALI

1. Introduzzjoni
2. Tbassir tad-durata tal-fażi ta' teħid
3. Tbassir tad-durata tal-fażi ta' tisfija
4. Metodu sekwenzjali: determinazzjoni tal-kostant tar-rata ta' tisfija (telf) k_2
5. Metodu sekwenzjali: determinazzjoni tal-kostant tar-rata ta' *teħid* k_1 (metodu tal-esponiment milwiem biss)
6. Mudell simultanju għall-kalkolu tal-kostanti tar-rati ta' teħid u tisfija (telf) (metodu tal-esponiment milwiem biss)
7. Korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir għall-BCF u l-BMF kinetiċi
8. Normalizzazzjoni għal-lipidu għal kontenut lipidu ta' 5 % (metodu tal-esponiment milwiem biss)

1. INTRODUZZJONI

Il-mudell tal-bijoakkumulazzjoni akkwatika ġenerali fil-hut jista' jiġi deskritt f'termini tal-proċessi ta' teħid u telf, filwaqt li jiġi injorat it-teħid mal-ikel. L-ekwazzjoni differenzjali (dC_f/dt) li tiddekrivi r-rata ta' bidla fil-koncentrazzjoni fil-hut ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{jum}^{-1}$) tinkiseb bi (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad \text{[Ekwazzjoni A5.1]}$$

Fejn

k_1 = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-teħid fil-hut ($\text{l} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{jum}^{-1}$).

k_2 = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-tisfija mill-hut (jum^{-1}).

k_g = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-tkabbir tal-hut ("dilwizzjoni tat-tkabbir") (jum^{-1}).

k_m = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għat-trasformazzjoni metabolika (jum^{-1})

k_e = Kostant tar-rata tal-ewwel ordni għall-eġestjoni tar-rawt (jum^{-1})

C_w = Koncentrazzjoni fl-ilma ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

C_f = Koncentrazzjoni fil-hut ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ piż niedi).

Għal sustanzi bijoakkumulanti, jista' jkun mistenni li medja ponderata għall-hin (TWA) hija l-iktar koncentrazzjoni tal-esponiment rilevanti fl-ilma (C_w) fi hdan il-medda awtorizzata ta' fluttwazzjoni (ara l-paragrafu 24). Huwa rakkomandat li tiġi kkalkolata koncentrazzjoni tal-ilma TWA, skont il-proċedura tal-Appendiċi 6 tat-TM C.20 (2). Ta' min jghid li l-In-trasformazzjoni tal-koncentrazzjoni tal-ilma hija xierqa meta jkun mistenni li ssehh dizintegrazzjoni esponenzjali bejn il-perjodi ta' tiġdid, eż. f'disinn tat-test semistatiku. F'sistema bi fluss kontinwu, jaf ma jkunx hemm bżonn ln-trasformazzjoni tal-koncentrazzjonijiet tal-esponiment. Jekk jinkisbu l-koncentrazzjonijiet tal-ilma TWA, dawn għandhom jiġu rrapportati u jintużaw f'kalkoli sussegwenti.

F'test tal-BCF standard fuq il-hut, it-teħid u t-tisfija jistghu jiġu deskritti f'termini ta' żewġ proċessi kinetiċi tal-ewwel ordni.

▼ M7

$$\text{Rate of uptake} = k_l \times C_w \quad [\text{Ekwazzjoni A5.2}]$$

$$\text{Overall loss rate} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{Ekwazzjoni A5.3}]$$

Fi stat stazzjonarju, jekk jiġu supponuti tkabbir u metabolizmu negligibbli (jiġifieri l-valuri għal k_g u k_m ma jistgħux jiġu distinti minn zero), ir-rata ta' tehid tilhaq ir-rata ta' tisfija, u b'hekk it-tagħqid tal-Ekwazzjoni A5.2 u l-Ekwazzjoni A5.3 jagħti r-relazzjoni li ġejja:

$$BCF = \frac{C_f - SS}{C_w - SS} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.4}]$$

Fejn

C_{f-SS} = Konċentrazzjoni fil-hut fi stat stazzjonarju (mg kg^{-1} piż niedi).

C_{w-SS} = Konċentrazzjoni fl-ilma fi stat stazzjonarju (mg l^{-1}).

Il-proporzjon ta' k^1/k_2 huwa l-BCF kinetiku (BCF_K) u għandu jkun daqs il-BCF fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) miksub mill-proporzjon tal-konċentrazzjoni fi stat stazzjonarju fil-hut għal dik fl-ilma, iżda jista' jkun hemm devjazzjonijiet jekk l-istat stazzjonarju kien inċert jew jekk ġew applikati korrezzjonijiet għat-tkabbir għall-BCF kinetiku. Madankollu, peress li k_1 u k_2 huma kostanti, l-istat stazzjonarju ma għandux bżonn jintlaħaq sabiex jinkiseb BCF_K .

Fuq il-bażi ta' dawn l-ekwazzjonijiet tal-ewwel ordni, dan l-Appendiċi 5 jinkludi l-kalkoli ġenerali mehtieġa kemm għal metodi ta' bjoakkumulazzjoni tal-esponiment milwiem kif ukoll djetetiku. Madankollu, is-sezzjonijiet 5, 6 u 8 huma rilevanti biss għall-metodu tal-esponiment milwiem iżda huma inkluzi hawnhekk peress li huma tekniki "ġenerali". Il-metodi sekwenzjali (sezzjonijiet 4 u 5) u simultanji (sezzjoni 6) jippermettu li jiġu kkalkolati l-kostanti ta' tehid u tisfija li jintużaw sabiex jinkisbu l-BCFs kinetiċi. Il-metodu sekwenzjali għad-determinazzjoni tal- k_2 (sezzjoni 4) huwa importanti għall-metodu djetetiku peress li huwa mehtieġ sabiex jiġu kkalkolati l-effiċjenza tal-assimilazzjoni kif ukoll il-BMF. L-Appendiċi 7 jispjega l-kalkoli li huma speċifiċi għall-metodu djetetiku.

2. TBASSIR TAD-DURATA TAL-FAŽI TA' TEHID

Qabel ma jsir it-test, stima tal- k_2 u, b'hekk, ċertu perċentwal tal-hin mehtieġ sabiex jintlaħaq stat stazzjonarju jistgħu jinkisbu mir-relazzjonijiet empiriċi bejn il- k_2 u l-koeffiċjent ta' partizzjoni n -ottanol/ilma (K_{OW}) jew k_1 u BCF. Madankollu, ta' min jgħid li l-ekwazzjonijiet f'din is-sezzjoni japplikaw biss meta t-tehid u t-tisfija jsegwu kinetika tal-ewwel ordni. Jekk jidher ċar li dan mhux il-każ, huwa rakkomandat li jifittex parir minghand espert fil-bijos-tatistika u/jew fil-farmakokinetika, jekk wiehed ikun jixtieq tbassiriet tal-fażi ta' tehid.

Stima tal- k_2 (jum^{-1}) tista' tinkiseb b'bosta metodi. Pereżempju, għall-ewwel jistgħu jintużaw ir-relazzjonijiet empiriċi li ġejjin ⁽¹⁾:

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{OW} \quad (r^2 = 0,95) \quad [(3); \text{Ekwazzjoni A5.5}]$$

jew

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.6}]$$

$$\text{Fejn } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (għal sustanzi b'log } K_{OW} > 3) \quad (r^2 = 0,85) \quad [(4); \text{Ekwazzjoni A5.7}]$$

⁽¹⁾ Bhal b'kull relazzjoni empirika, għandu jiġi verifikat li s-sustanza tat-test taqa' fi hdan id-dominju ta' applikabilità tar-relazzjoni

▼ M7

$$U_{BCF} = 10^{(0.910 \cdot \log K_{OW} - 1.975 \cdot \log(6.8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0.786)} \quad (r^2 = 0.90) \quad [(5); \text{Ekwazzjoni A5.8}]$$

W = piż medju tal-ħut tat-trattament (grammi piż niedi) fi tmiem it-teħid/bidu tat-tisfija ⁽¹⁾

Għal relazzjonijiet oħrajn, ara (6). Jista' jkun ta' vantaġġ li jintużaw mudelli iktar ikkumplikati fl-istima tal- k_2 jekk, pereżempju, ikun probabbli li jista' jsehh metabolizmu sinifikanti (7) (8). Madankollu, iktar ma tiżdied il-kumplessità tal-mudell, iktar wiehed għandu joqghod attent fl-interpretazzjoni tat-tbassiriet. Pereżempju, il-preżenza ta' gruppi nitro tista' tindika metabolizmu veloċi, iżda dan mhuwiex dejjem il-każ. Għalhekk, l-utent għandu jiżen ir-riżultati tal-metodu tat-tbassir kontra l-istruttura kimika u kwalunkwe informazzjoni rilevanti oħra (pereżempju studji preliminari) fl-iskedar ta' studju.

Iż-żmien sabiex jintlaħaq ċertu perċenwal ta' stat stazzjonarju jista' jinkiesb, billi tiġi applikata l-istima tal- k_2 , mill-ekwazzjoni kinetika ġenerali li tiddekrivi t-teħid u t-tisfija (kinetika tal-ewwel ordni), jekk jiġi supponut li t-tkabbir u l-metabolizmu jkun neglġibbli. Jekk isehh tkabbir sostanzjali matul l-istudju, l-istimi deskritti hawn taht ma jibqgħux affidabbli. F'dawn il-każijiet, aħjar li jintuża k_{2g} ikkoreġut għat-tkabbir kif deskritt iktar tard (ara s-Sezzjoni 7 ta' dan l-Appendiċi):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad [\text{Ekwazzjoni A5.9}]$$

jew, jekk C_w huwa kostant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ekwazzjoni A5.10}]$$

Meta joqrob l-istat stazzjonarju ($t \rightarrow \infty$), l-Ekwazzjoni A5.10 (ara (9) (10)) tista' titnaqqas għal:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad [\text{Ekwazzjoni A5.11}]$$

jew

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad [\text{Ekwazzjoni A5.12}]$$

Il- $BCF \times C_w$ huwa approssimazzjoni għall-konċentrazzjoni fil-ħut fi stat stazzjonarju ($C_{f,ss}$). [Nota: jista' jintuża l-istess approċċ meta jiġi stmat BMF fi stat stazzjonarju bit-test djetetiku. F'dan il-każ, il-BCF huwa sostitwit mal-BMF u C_w ma' C_{food} , il-konċentrazzjoni fl-ikel, fl-ekwazzjonijiet ta' hawn fuq]

L-Ekwazzjoni A5.10 tista' tkun traskritta għal:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ekwazzjoni A5.13}]$$

jew

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.14}]$$

Bl-applikazzjoni tal-Ekwazzjoni A5.14, il-hin sakemm jintlaħaq ċertu perċenwal ta' stat stazzjonarju jista' jitbassar meta k_2 jiġi stmat minn qabel bl-Ekwazzjoni A5.5 jew l-Ekwazzjoni A5.6.

Bhala linja ta' gwida, l-aħjar durata statistika tal-fażi ta' teħid għall-produzzjoni ta' dejta statistikament aċċettabbli (BCF_K) hija dak il-perjodu li huwa meħtieġ għall-kurva tal-logaritma tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut plottjata

⁽¹⁾ Il-piż tal-ħut fi tmiem il-fażi ta' teħid jista' jiġi stmat mid-dejta minn studji jew għarfien preċedenti taż-żieda probabbli fid-daqs tal-ispeċi tat-test minn piż tal-bidu tipiku tat-test tul durata tipika tat-teħid (eż. 28 jum).

▼ **M7**

kontra l-hin lineari sabiex jintlaħaq tal-inqas 50 % tal-istat stazzjonarju (jigifieri $0,69/k_2$), izda mhux iktar minn 95 % tal-istat stazzjonarju (jigifieri $3,0/k_2$) (11). F'każ li l-akkumulazzjoni titla' għal iktar minn 95 % tal-istat stazzjonarju, il-kalkolu ta' BCF_{SS} isir fattibbli.

Il-hin sabiex jintlaħaq 80 % tal-istat stazzjonarju huwa (bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.15}]$$

jew

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.16}]$$

B'mod simili, il-hin sabiex jintlaħaq 95 fil-mija tal-istat stazzjonarju huwa:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.17}]$$

Pereżempju, id-durata tal-fażi ta' teħid (jigifieri l-hin sabiex jintlaħaq ċertu perċentwal ta' stat stazzjonarju, eż. t_{80} jew t_{95}) għal sustanza tat-test b'log $K_{OW} = 4$ tkun (bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.5, l-Ekwazzjoni A5.16 u l-Ekwazzjoni A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ jum}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ days}(59 \text{ hours})$$

$$\text{jew } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ days}(110 \text{ hours})$$

Inkella, l-espressjoni:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (hours)} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.18}]$$

tista' tintuża sabiex jiġi kkalkolat il-hin sabiex jintlaħaq stat stazzjonarju effettiv (t_{eSS}) (12). Għal sustanza tat-test b'log $K_{OW} = 4$ dan jirriżulta fi:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ hours}$$

3. TBASSIR TAD-DURATA TAL-FAŽI TA' TISFIJA

Tbassir taż-żmien meħtieġ sabiex jitnaqqas it-toqol fil-ġisem għal ċertu perċentwal tal-konċentrazzjoni inizjali jista' jinkiseb mill-ekwazzjoni generali li tiddekrivi t-teħid u t-tisfija (jekk tiġi supponuta kinetika tal-ewwel ordni, ara l-Ekwazzjoni A5.9 (1) (13).

Għall-fażi ta' tisfija, huwa supponut li C_w (jew C_{food} għat-test djetetiku) hija zero. Imbagħad l-ekwazzjoni tista' titnaqqas għal:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad [\text{Ekwazzjoni A5.19}]$$

jew

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.20}]$$

fejn $C_{f,0}$ hija l-konċentrazzjoni fil-bidu tal-perjodu ta' tisfija.

imbagħad tintlaħaq tisfija ta' 50 fil-mija fil-hin (t_{50}):

▼ **M7**

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

jew

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

B'mod simili, tisfija ta' 95 fil-mija sejra tintlaħaq fi:

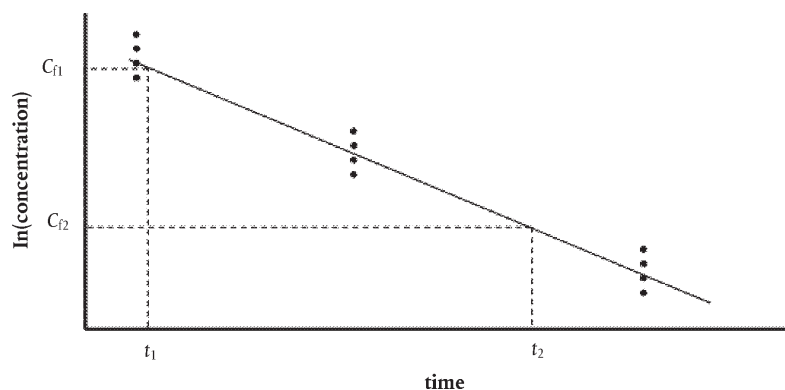
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Jekk jintuza teħid ta' 80 % għall-ewwel perġodu ($1,6/k_2$) u telf ta' 95 % fil-fażi ta' tisfija ($3,0/k_2$), il-fażi ta' tisfija tkun madwar id-doppju tad-durata tal-fażi ta' teħid.

Kun af li l-istimi huma bbazati fuq is-suppożizzjoni li x-xejriet ta' teħid u tisfija sejr in segwu l-kinetika tal-ewwel ordni. Jekk ikun ovvj u li mhijiex segwita l-kinetika tal-ewwel ordni, dawn l-istimi ma jkunux validi.

4. METODU SEKWENZJALI: DETERMINAZZJONI TAL-KOSTANT TAR-RATA TA' TISFIJA (TELF) K_2

Hafna mid-dejta dwar il-bijokoncentrazzjoni giet supponuta bħala deskritta "ragonevolment" tajjeb b'semplici mudell b'żewġ kompartimenti/żewġ parametri, kif indikat mill-kurva rettilineari li tqarreb għall-punti għall-koncentrazzjonijiet fil-hut (l'ln skala), matul il-fażi ta' tisfija.



Kun af li d-devjazzjonijiet minn linja dritta jistgħu jindikaw xejra ta' tisfija iktar kumplessa mill-kinetika tal-ewwel ordni. Il-metodu grafiku jista' jiġi applikat sabiex ikunu rizolti tipi ta' tisfija li jiddevjaw mill-kinetika tal-ewwel ordni.

Sabiex jiġi kkalkolat il- k_2 għall-punti ta' hin multipli (ta' kampjunar), aghmel rigressjoni lineari tal- $\ln(\text{koncentrazzjoni})$ kontra l-hin. Il-pendil tal-linja ta' rigressjoni huwa stima tal-kostant tar-rata ta' tisfija k_2 ⁽¹⁾. Mill-interċetta faċilment tista' tiġi kkalkolata l-koncentrazzjoni medja fil-hut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija ($C_{0,d}$; li hija daqs il-koncentrazzjoni medja fil-hut fi tmiem il-fażi ta' teħid) (inkluzi l-margnijiet ta' żball) ⁽¹⁾:

⁽¹⁾ F'hafna programmi li jippermettu rigressjoni lineari, jingħataw ukoll żbalji standard u intervall tal-kunfidenza (CI) tal-istimi, eż. fil-Microsoft Excel bl-użu tal-pakkett ta' għodod ta' Data Analysis.

▼ M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.21}]$$

Sabiex tikkalkola k_2 meta jkun hemm żewġ punti ta' hin (tal-kampjunar) disponibbli (bhal fid-disinn minimizzat), issostitwixxi $\bar{z}$ -żewġ konċentrazzjonijiet medji fl-ekwazzjoni li ġejja

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.22}]$$

Meta $\ln(C_{f1})$ u $\ln(C_{f2})$ ikunu l-logaritmi naturali tal-konċentrazzjonijiet fil-hinijiet t_1 u t_2 , rispettivament, u t_2 u t_1 huma l-hinijiet meta ngabru $\bar{z}$ -żewġ kampjuni b'rabta mal-bidu tat-tisfija ⁽¹⁾.

5. METODU SEKWENZJALI: DETERMINAZZJONI TAL-KOSTANT TAR-RATA TA' TEHID K_1 (METODU TAL-ESPONIMENT MILWIEM BISS)

Sabiex issib valur għall- k_1 b'sett ta' dejta dwar il-konċentrazzjoni tal-hin sekwenzjali għall-fażi ta' tehid, uża programm tal-kompjuter sabiex thaddem il-mudell li ġejj:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Ekwazzjoni A5.23}]$$

Fejn k_2 jinkiseb bil-kalkolu preċedenti, $C_f(t)$ u $C_w(t)$ huma l-konċentrazzjonijiet fil-hut u l-ilma, rispettivament, fil-hin t .

Sabiex tikkalkola k_1 meta jkun hemm żewġ punti ta' hin (tal-kampjunar) biss disponibbli (bhal fid-disinn minimizzat), uża l-formula li ġejja:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.24}]$$

Meta k_2 jinkiseb bil-kalkolu preċedenti, C_f hija l-konċentrazzjoni fil-hut fil-bidu tal-fażi ta' tisfija, u C_w hija l-konċentrazzjoni medja fl-ilma matul il-fażi ta' tehid ⁽²⁾.

Tista' ssir spezzjoni viziva tal-pendili tal- k_1 u k_2 meta plottjati kontra d-dejta tal-punti tal-kampjun imkejla sabiex tiġi vvalutata l-idoneità tal-iffittjar. Jekk minn dan jirriżulta li l-metodu sekwenzjali ta' stima hażina għall- k_1 , għandu jiġi applikat l-approċċ simultanju sabiex jiġu kkalkolati l- k_1 u l- k_2 (ara s-sezzjoni 6 li jmiss). Mill-ġdid, il-pendili li jirriżultaw għandhom jitqabblu mad-dejta mkejla plottjata għall-ispezzjoni viziva tal-idoneità tal-iffittjar. Jekk l-iffittjar ikun għadu hażin, dan jista' jkun indikazzjoni li l-kinetika tal-ewwel ordni ma tapplikax u li għandhom jintużaw mudelli ohrajn iktar kumpleksi.

6. MUDELL SIMULTANJU GHALL-KALKOLU TAL-KOSTANTI TAR-RATI TA' TEHID U TISFIJA (TELF) (METODU TAL-ESPONIMENT MILWIEM BISS)

Jistgħu jintużaw programmi tal-kompjuter sabiex jinstabu l-valuri għal k_1 u k_2 b'sett ta' dejta dwar il-konċentrazzjoni tal-hin sekwenzjali u l-mudell:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{Ekwazzjoni A5.25}]$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad [\text{Ekwazzjoni A5.26}]$$

fejn

t_c = il-hin fi tmiem il-fażi ta' tehid.

Dan l-approċċ jipprovdi direttament żbalji standard għall-istimi ta' k_1 u k_2 . Meta k_1/k_2 jiġi sostitwit mill-BCF (ara l-Ekwazzjoni A5.4) fl-Ekwazzjoni A5.25 u l-Ekwazzjoni A5.26, l-iżball standard u s-CI ta' 95 % tal-BCF jistgħu

⁽¹⁾ Għall-kuntrarju tal-metodu ta' rigressjoni lineari, l-użu ta' din il-formula mhuwiex sejjer irendi żball standard għall- k_2 .

⁽²⁾ Għall-kuntrarju tal-proċedura ta' ffittjar lineari, dan il-metodu normalment ma jrendix żball standard jew intervall ta' fiduċja għall- k_1 stmat.

▼ M7

jigü stmati wkoll. Dan huwa partikolarment siewi meta jitqabblu stimi differenti minhabba t-trasformazzjoni tad-dejta. Il-varjabbli dipendenti (koncentrazzjoni tal-hut) jista' jigi ffittjat bl-ln trasformazzjoni jew minghajr, u tista' tigi evalwata l-inċertezza li tirriżulta tal-BCF.

Peress li teżisti korrelazzjoni b'saħħitha bejn iż-żewġ parametri k_1 u k_2 jekk jigü stmati fl-istess hin, jista' jkun rakkomandat li l-ewwel jigi kkalkolat il- k_2 mid-dejta dwar it-tisfija biss (ara iktar 'il fuq); k_2 f'hafna mill-kazijiet jista' jigi stmat mill-kurva ta' tisfija bi preċiżjoni relattivament kbira. Imbagħad ikun jista' jigi kkalkolat il- k_1 mid-dejta dwar it-tehid bl-użu ta' rigressjoni mhux lineari ⁽¹⁾. Huwa rakkomandat li tintuża l-istess trasformazzjoni tad-dejta meta jsir iffittjar sekwenzjali.

Tista' ssir spezzjoni viżiva tal-pendili li jirriżultaw meta plottjati kontra d-dejta tal-punti tal-kampjun imkejla sabiex tigi vvalutata l-idoneità tal-iffittjar. Jekk minn dan jirriżulta li dan il-metodu ta stima hażina għall- k_1 , ikun jista' jigi applikat l-approċċ simultanju sabiex jigü kkalkolati l- k_1 u l- k_2 . Mill-gdid, il-mudell iffittjat għandu jitqabbel mad-dejta mkejla plottjata għall-ispezzjoni viżiva tat-tjubija tal-iffittjar u l-istimi tal-parametri li jirriżultaw għal k_1 , k_2 u l-BCF li jirriżulta u l-iżbalji standard tagħhom u/jew l-intervalli ta' kunfidenza għandhom jitqabblu bejn tipi differenti ta' ffittjar.

Jekk l-iffittjar ikun hażin, dan jista' jkun indikazzjoni li l-kinetika tal-ewwel ordni ma tapplikax u li għandhom jintużaw mudelli ohrajn iktar kumplessi. Wahda mill-iktar kumplikazzjonijiet komuni hija tkabbir tal-hut matul it-test.

7. KORREZZJONI TAD-DILWIZZJONI TAT-TKABBIR GĦALL-BCF U L-BMF KINETIĊI

Din is-sezzjoni tiddekrivi metodu standard għall-korrezzjoni minhabba t-tkabbir tal-hut matul it-test (l-hekk imsejha “dilwizzjoni tat-tkabbir”) li huwa validu biss meta tkun applika kinetika tal-ewwel ordni. F'każ li jkun hemm indikazzjonijiet li ma tapplikax kinetika tal-ewwel ordni, huwa rakkomandat li jitfittex parir minghand espert fil-bijostatistika għal korrezzjoni tajba tad-dilwizzjoni tat-tkabbir jew għall-użu tal-approċċ ibbażat fuq il-massa deskritt hawn taht.

F'ċerti kazijiet, dan il-metodu għall-korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir huwa soġġett għal nuqqas ta' preċiżjoni u kultant ma jahdimx (pereżempju għal sustanzi b'tisfija bil-mod hafna ttestjati f'hut li jikber malajr, il-kostant tar-rata ta' tisfija derivat ikkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, il- k_2 , jista' jkun żgħir hafna u b'hekk l-errur fiż-żewġ kostanti tar-rati uzati sabiex jinkiseb isir kritiku, u f'ċerti kazijiet l-istimi tal- k_2 jistgħu jkunu ikbar mill- k_2). F'dawn il-kazijiet, jista' jintuża approċċ alternattiv (jiġifieri approċċ tal-massa), li jahdem ukoll meta ma tkunx segwita kinetika tat-tkabbir tal-ewwel ordni, li jevita l-bżonn tal-korrezzjoni. Dan l-approċċ huwa spjegat fi tmiem din is-sezzjoni.

Metodu ta' tnaqqis tal-kostant tar-rata ta' tkabbir għall-korrezzjoni tat-tkabbir

Għall-metodu standard, id-dejta dwar il-piż u t-tul individwali kollha tigi konvertita f'logaritmi naturali u $\ln(\text{piż})$ jew $\ln(1/\text{piż})$ jigi plottjat vs iż-żmien (jum), b'mod separat għall-gruppi tat-trattament u tal-kontroll. Isir l-istess proċess għad-dejta mill-fażijiet ta' tehid u tisfija b'mod separat. Generalment, għall-korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir, huwa iktar xieraq li tintuża d-dejta dwar il-piż mill-istudju shiħ sabiex jinkiseb il-kostant tar-rata ta' tkabbir

⁽¹⁾ Għandu jingħad li l-inċertezza fl-istima tal- k_2 ma tintużax kif suppost fil-mudell ta' bjoakkumulazzjoni meta dan essenzjalment jitqies bħala kostant meta jigi ffittjat il- k_1 fil-metodu ta' ffittjar sekwenzjali. Għalhekk, l-inċertezza tal-BCF li tirriżulta sejra tkun differenti bejn il-metodi ta' ffittjar simultanju u sekwenzjali.

▼ **M7**

(k_g), izda differenzi statistikament sinifikanti bejn il-kostanti tar-rata ta' tkabbir derivati għall-fażi ta' teħid u l-fażi ta' tisfija jistgħu jindikaw li għandu jintuża l-kostant tar-rata tal-fażi ta' tisfija. Ir-rati ta' tkabbir kumplessivi għal studji milwiema għall-gruppi tat-test u tal-kontroll jistgħu jintużaw sabiex jiġi verifikat hemmx xi effetti marbut mat-trattament.

Tiġi kkalkolata korrelazzjoni tal-inqas kwadri lineari għal- $\ln(\text{piż tal-ħut})$ vs il-jum (u għal- $\ln(1/\text{piż})$ vs il-jum) għal kull grupp (gruppi tat-test(ijiet) u tal-kontroll, dejta individwali, mhux valuri medji ta' kuljum) għall-istudju shih, il-fażijiet ta' teħid u tisfija bl-użu ta' proċeduri statistiċi standard. Il-varjanzi fil-pendili tal-linji huma kkalkolati u jintużaw sabiex tiġi evalwata s-sinifikanza statistika ($p = 0,05$) tad-differenza fil-pendili (kostanti tar-rata ta' tkabbir) bl-użu tat-test- t ta' Student (jew ANOVA jekk jiġu ttestjati iktar minn konċentrazzjoni waħda). Ġeneralment hija ppreferuta dejta dwar il-piż għal finijiet ta' korrezzjoni tat-tkabbir. Id-dejta dwar it-tul, ittrattata bl-istess mod, tista' tkun siewja sabiex jitqabblu l-gruppi tal-kontroll u tat-test għal effetti relatati mat-trattament. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti fl-analiżi tad-dejta dwar il-piż, id-dejta dwar it-test u l-kontroll tista' tingabar f'daqqa u jiġi kkalkolat kostant totali tar-rata ta' tkabbir tal-ħut għall-istudju (k_g) bħala l-pendil totali tal-korrelazzjoni lineari. Jekk jiġu osservati differenzi statistikament sinifikanti, il-kostanti tar-rata ta' tkabbir għal kull grupp tal-ħut, u/jew il-fażi ta' studju, jiġu rrapportati b'mod separat. Imbagħad, il-kostant tar-rata minn kull grupp tat-trattament għandu jintuża għall-finijiet ta' korrezzjoni tad-dilwizzjoni tat-tkabbir ta' dak il-grupp. Jekk ġew osservati differenzi statistiċi bejn il-kostanti tar-rata tal-fażi ta' teħid u tisfija, għandhom jintużaw il-kostanti tar-rata ta' teħid tal-fażi ta' tisfija.

Il-kostant tar-rata ta' tkabbir ikkalkolat (k_g espress bħala jum^{-1}) jista' jitnaqqas mill-kostant totali tar-rata ta' tisfija (k_2) sabiex jinhareġ kostant tar-rata ta' tisfija, k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad [\text{Ekwazzjoni A5.27}]$$

Il-kostant tar-rata ta' teħid jiġi diviż bil-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir sabiex jinkiseb il-BCF kinetiku kkoreġut għat-tkabbir, il- BCF_{K_g} (jew BMF_{K_g}) denotat.

$$\text{BCF}_{K_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad [\text{Ekwazzjoni A5.28}]$$

Il-kostant tar-rata ta' tkabbir derivat għal studju djetetiku jintuża fl-Ekwazzjoni A7.5 sabiex jiġi kkalkolat il- BMF_{K_g} ikkoreġut għat-tkabbir (ara l-Appendiċi 7).

Metodu bbażat fuq il-massa għall-korrezzjoni tat-tkabbir

Kif inhu spjegat hawn, tista' tintuża alternattiva għall-“metodu ta' tnaqqis tal-kostant tar-rata ta' tkabbir” imsemmi iktar 'il fuq li jevita l-htieġa ta' korrezzjoni għat-tkabbir. Il-prinċipju huwa li tintuża dejta dwar it-tisfija fuq bażi ta' massa għal ħut shih minflok fuq bażi ta' konċentrazzjoni.

Ikkonverti l-konċentrazzjonijiet tat-tessut fil-fażi ta' tisfija (massa ta' sustanza tat-test/massa unitarja tal-ħut) f'massa ta' sustanza tat-test/ħut: qabbel il-konċentrazzjonijiet u l-piżijiet tal-ħut individwali f'forma ta' tabella (eż. fi spreadsheet fuq il-kompjuter) u mmultiplika kull konċentrazzjoni bil-piż tal-ħut totali għal dak il-kejl sabiex tohroġ sett ta' sustanza tat-test tal-massa/ħut għall-kampjuni kollha tal-fażi ta' tisfija.

Ipplottja l-logaritma naturali li tirriżulta tad-dejta dwar il-massa tas-sustanza kontra $\ln$ -żmien għall-esperiment (fażi ta' tisfija) kif isir normalment.

▼ M7

Għall-metodu tal-esponiment milwiem, għib il-kostant tar-rata ta' teħid f'rutina (ara s-sezzjonijiet 4 u 6), kun af li għandu jintuża l-valur “normali” tal- k_2 fl-ekwazzjonijiet tal-iffittjar tal-kurva għal k_1) u ohroġ il-kostant tar-rata ta' tisfija mid-dejta ta' hawn fuq. Peress li l-valur li jirriżulta għall-kostant tar-rata ta' tisfija huwa indipendenti mit-tkabbir peress li nħareġ fuq il-bażi tal-massa għal kull ħuta shiħa, dan għandu jiġi denotat bħala k_{2g} u mhux k_2 .

8. NORMALIZZAZZJONI GĦAL-LIPIDU GĦAL KONTENUT LIPIDU TA' 5 % (METODU TAL-ESPONIMENT MILWIEM BISS)

Ir-riżultati tal-BCF (kinetiku u fi stat stazzjonarju) minn testijiet tal-esponiment milwiem għandu jiġi rrapportat ukoll b'rabta mal-kontenut lipidu tal-ħut prestabbilit ta' 5 % piż niedi, sakemm ma jkunx jista' jiġi argumentat li s-sustanza tat-test ma takkumulax primarjament fl-lipidu (eż. ċerti sustanzi perfluorinati jistgħu jaqdbu mal-proteini). Id-dejta dwar il-konċentrazzjoni fil-ħut, jew il-BCF, trid tiġi kkonvertita f'bażi tal-piż niedi tal-kontenut lipidu ta' 5 %. Jekk intuża l-istess ħut għall-kejl tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza u l-kontenuti ta' lipidu fil-punti ta' kampjunar kollha, dan jeħtieġ li kull konċentrazzjoni mkejla individwali fil-ħut tiġi kkoreġuta għall-kontenut lipidu ta' dik il-ħuta.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad [\text{Ekwazzjoni A5.29}]$$

fejn

$C_{f,L}$ = konċentrazzjonijiet fil-ħut normalizzata għal-lipidu (mg kg^{-1} piż niedi)

L = frazzjoni ta' lipidu (abbazi tal-piż niedi)

C_f = konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-ħut (mg kg^{-1} piż niedi)

Jekk l-analiżi tal-lipidu ma saritx fil-ħut kollu fil-kampjun, jintuża valur medju tal-lipidu sabiex jiġi normalizat il-BCF. Għall-BCF fi stat stazzjonarju, għandu jintuża l-valur medju rreġistrat fi tmiem il-fażi ta' teħid fil-grupp tat-trattament. Għan-normalizzazzjoni ta' BCF kinetiku, jista' jkun hemm xi bidliet li fihom ikun iġġustifikat li jittiehed approċċ differenti, pereżempju jekk il-kontenut lipidu jkun inbidel sew matul il-fażi ta' teħid jew tisfija. Madankollu, rata ta' tagħlif li tnaqqas kemm jista' jkun il-bidliet drammatiċi fil-kontenut lipidu għandha tintuża bħala rutina xorta wahda.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \quad [\text{Ekwazzjoni A5.30}]$$

fejn

BCF_{KL} = BCF kinetiku normalizzat għal-lipidu (L kg^{-1})

L_n = frazzjoni medja ta' lipidu (abbazi tal-piż niedi)

BCF_K = BCF kinetiku (L kg^{-1})

TAGHRIF

- (1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) Chapter C.20 of this Annex, *Daphnia magna* Reproduction Test.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.

▼ **M7**

- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
- (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
- (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
- (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
- (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.

▼ M7

Appendiċi 6

SEZZJONI TAL-EKWAZZJONI GHAT-TEST TAL-ESPONIMENT MILWIEM: DISINN TAT-TEST MINIMIZZAT

Ir-raġuni wara dan l-approċċ hija li l-fattur ta' bijokonċentrazzjoni f'test shih jista' jew jiġi stabbilit bħala fattur ta' bijokonċentrazzjoni fi stat stazzjonarju (BCF_{SS}) billi jiġi kkalkolat il-proporzjon tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tessut tal-hut għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma, jew billi jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika (BCF_K) bħala l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' tehid k_1 għall-kostant tar-rata ta' tisfija k_2 . Il- BCF_K huwa validu anki jekk ma tintlaħaqx konċentrazzjoni fi stat fiss ta' sustanza matul it-tehid, diment li t-tehid u t-tisfija jaġixxu bejn wiehied u iehor skont il-proċessi tal-kinetika tal-ewwel ordni.

Jekk isir kejl tal-konċentrazzjoni tas-sustanza fit-tessuti (C_f) meta jintemm l-esponiment (t_1) u l-konċentrazzjoni fit-tessut (C_{t2}) terġa' titkejjel wara li jgħaddi perġodu ta' żmien (t_2), ikun jista' jiġi stmat il-kostant tar-rata ta' tisfija (k_2) bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.22 mill-Appendiċi 5.

Imbagħad ikun jista' jiġi stabbilit b'mod alġebrajku l-kostant tar-rata ta' tehid, k_1 , bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.23 mill-Appendiċi 5 (fejn C_f hija daqs C_{f1} u t huwa daqs t_1) (1). B'hekk, il-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika għad-disinn minimizzat (deżinjat bħala BCF_{Km} sabiex jintgħaraf mill-fattur ta' bijokonċentrazzjoni kinetika ddeterminati bl-użu ta' metodi oħrajn) huwa:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{Ekwazzjoni A6.1}]$$

Il-konċentrazzjonijiet jew ir-riżultati għandhom jiġu kkoreġuti għad-dilwizzjoni tat-tkabbir u jiġu normalizzati għal kontenut lipidu tal-hut ta' 5 %, kif inhu deskritt fl-Appendiċi 5.

Il- BCF_{SS} minimizzat huwa l- BCF ikkalkolat fi tmiem il-fażi ta' tehid, filwaqt li jiġi supponut li ntlaħaq stat stazzjonarju. Dan jista' jiġi supponut biss, għaliex in-numru ta' punti ta' kampjunar mhuwiex biżżejjed sabiex tingħata prova ta' dan).

$$\text{minimised } BCF_{SS} = \frac{C_{f - \text{minSS}}}{C_{w - \text{minSS}}} \quad [\text{Ekwazzjoni A6.2}]$$

Fejn

$C_{f - \text{minSS}}$ = Konċentrazzjoni fil-hut fi stat stazzjonarju supponut fi tmiem it-tehid (mg kg^{-1} piz niedi).

$C_{w - \text{minSS}}$ = Konċentrazzjoni fl-ilma fi stat stazzjonarju supponut fi tmiem it-tehid (mg l^{-1}).

TAGHRIF

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼ **M7***Appendiċi 7***SEZZJONI TAL-EKWAZZJONI GHAT-TEST TAL-ESPONIMENT DJETETIKU**

1. Eżempju ta' kwantitajiet kostitwenti ta' ikel kummerċjali xieraq għall-hut
2. Eżempji ta' teknika ta' żieda tas-sustanza mal-ikel
3. Kalkolu tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni u l-fattur ta' bijomanjifikazzjoni
4. Korrezzjoni għal-lipidu
5. Evalwazzjoni tad-differenzi bejn konċentrazzjoni mkejla fiż-żmien żero ($C_{0,m}$) u konċentrazzjoni derivata fil-hin żero ($C_{0,d}$)
6. Gwida għal sustanzi tat-test b'tisfija veloċi ħafna

1. EŻEMPJU TA' KWANTITAJIET KOSTITWENTI TA' IKEL KUMMERĊJALI XIERAQ GĦALL-HUT

Kostitwent ewlieni	hut mithun
Proteina Mhux Raffinata	$\leq 55,0 \%$
Xaħam mhux raffinat	$\leq 15,0 \%$ ⁽¹⁾
Fibra Mhux Raffinata	$\geq 2,0 \%$
Umdità	$\geq 12 \%$
Irmied	$\geq 8 \%$

⁽¹⁾ F'ċerti reġjuni, jista' jkun possibbli biss li jinkiseb għalf tal-hut b'konċentrazzjoni ta' lipidu li tkun inqas minn dan il-limitu superjuri. F'ċerti każijiet, għandhom isiru studji bil-konċentrazzjoni inferjuri ta' lipidu fl-ikel kif fornit, u r-rata tat-tagħlif tiġi aġġustata kif xieraq sabiex tinzamm is-saħħa tal-annimali. Il-lipidi tad-dieta ma għandhomx jiżjeddu b'mod artifiċjali b'żieda taz-żejt eċċessiv.

2. EŻEMPJI TA' TEKNIKA TA' ŻIEDA TAS-SUSTANZA MAL-IKEL**Punti Ġenerali**

Id-dieta tal-kontroll għandhom jithejjew bl-istess mod eżatt bħad-dieta miżjuda, iżda fin-nuqqas tas-sustanza tat-test.

Sabiex tiġi verifikata l-konċentrazzjoni tad-dieta ttrattata, għandhom jiġu estratti kampjuni triplikati tal-ikel dożat b'metodu ta' estrazzjoni xieraq u titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jew ir-radjuattività fl-estratti. Għandhom jintwerew irkupri ta' grad għoli ($> 85 \%$) b'varjazzjoni baxxa bejn il-kampjuni (tliet konċentrazzjonijiet tal-kampjun għas-sustanza meħuda fil-bidu tat-test ma għandhomx ivarjaw b'iktar minn $\pm 15 \%$ mill-medja).

Matul it-test dietetiku, għandhom jingabru tliet kampjuni tad-dieta għall-analiżi fil-jum 0 u fi tmiem il-fażi ta' teħid sabiex jiġi stabbilit il-kontenut tas-sustanza tat-test fid-dieta.

Preparazzjoni tal-ikel tal-hut b'materjal tat-test likwidu (pur)

Tiġi stabbilita konċentrazzjoni nominali fil-mira tat-test fl-ikel tal-hut tat-tratament, pereżempju $500 \mu\text{g}$ sustanza tat-test/g ikel. Il-kwantità xierqa (skont il-massa molar i jew ir-radjuattività speċifika) tas-sustanza tat-test pura tiżdied ma' massa magħrufa ta' ikel tal-hut f'garra tal-ħgieg jew bozza tal-evaporazzjoni rotatorja. Il-massa tal-ikel tal-hut għandha tkun biżżejjed għad-durata tal-fażi ta' teħid (filwaqt li titqies il-ħtieġa ta' kwantitajiet ikbar f'kull għalf

▼ M7

minhabba li jikber il-hut). L-ghalf tal-hut/is-sustanza tat-test għandhom jithalltu matul il-lejl b'thawwid bil-mod (eż. bl-użu ta' roto-rack mixer jew b'rotazzjoni jekk tintuża bozza tal-evaporazzjoni rotatorja). Id-dieta miżjuda għandha tinhażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-istabilità tas-sustanza tat-test fi hdan it-tahlita tal-ghalf (eż. tkessih) sakemm tintuża.

Preparazzjoni tal-ikel tal-hut b'veikolu taż-żejt tal-qamhirrum jew tal-hut

Is-sustanzi solidi tat-test għandhom jintahnu f'mehriez biex jiġu trab fin. Is-sustanzi likwidi tat-test jistgħu jiżdiedu direttament maż-żejt tal-qamhirrum jew tal-hut. Is-sustanza tat-test hija dissolta fi kwantità magħrufa ta' żejt tal-qamhirrum jew tal-hut (eż. 5-15-il ml). Iż-żejt iddożat jiġi ttrasferit b'mod kwantitattiv f'bozza tal-evaporazzjoni rotatorja ta' qies xiearq. Il-flask użat għat-thejjiya taż-żejt iddożat għandu jitlahlah b'zewġ alikwoti żgħar ta' żejt u dawn jiżdiedu fil-bozza sabiex jiġi żgurati li tiġi ttrasferita s-sustanza dissolta kollha tat-test. Sabiex tiġi żgurata dissoluzzjoni/dispersjoni sħiħa fiż-żejt (jew jekk tintuża iktar minn sustanza waħda tat-test fl-istudju), jiżdied mikro-hawwad, jingħalaq il-flask u t-tahlita titthawwad b'mod rapidu matul il-lejl. Fil-bozza tiżdied kwantità xierqa ta' dieta tal-hut (normalment fil-forma ta' gerbub) għat-test, u l-kontenuti tal-bozza jithalltu b'mod omoġenju bil-qlib kontinwu tal-bozza tal-ħġieg għal tal-inqas 30 minuta, izda idealment matul il-lejl sħiħ. Għalhekk, l-ikel miżjud bis-sustanza jinhażen kif xiearq (eż. imkessah) sabiex tiġi żgurata stabbiltà fis-sustanza tat-test fl-ikel sakemm tintuża.

Preparazzjoni tal-ikel tal-hut b'solvent organiku

Kwantità xierqa tas-sustanza tat-test (b'massa molari jew radjuattività speċifika) biżżejjed sabiex tintlaħaq id-doża fil-mira tiġi dissolta f'solvent organiku xiearq (eż. ċikloessan jew aċeton; 10-40 ml, izda volum ikbar jekk ikun hemm bżonn, skont il-kwantità tal-ikel li miegħu trid tiżdied is-sustanza). Alikwota ta' din is-soluzzjoni, jew kollha kemm hi (miżjuda skont il-porzjon), titthallat mal-massa xierqa ta' ikel tal-hut li tkun biżżejjed sabiex it-test jilhaq il-livell nominali meħtieġ tad-doża. L-ikel/is-sustanza tat-test jistgħu jithalltu fi skutella tat-tahlit tal-azzar inossidabbli u l-ikel tal-hut iddożat frisk li jifdal fl-iskutella f'hood tal-laboratorju għal jumejn (jithawwad kultant) sabiex is-solvent żejjed ikun jista' jevapora, jew jithallat f'bozza b'evaporazzjoni rotatorja b'rotazzjoni kontinwa. Is-solvent żejjed jista' "jittajjar" taht fluss ta' arja jew nitroġenu, jekk ikun hemm bżonn. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurati li s-sustanza tat-test ma tikkristallizzax hu u jitneħħa s-solvent. Id-dieta miżjuda għandha tinhażen f'kundizzjonijiet li jżommu l-istabilità tas-sustanza tat-test fi hdan it-tahlita tal-ghalf (eż. tkessih) sakemm tintuża.

3. KALKOLU TAL-EFFIĊJENZA TAL-ASSIMILAZZJONI U L-FATTUR TA' BIJOMANJIFIKAZZJONI

Sabiex tiġi kkalkolata l-effiċjenza tal-assimilazzjoni, l-ewwel għandu jiġi stmat il-kostant totali tar-rata ta' tisfija skont is-sezzjoni 4 tal-Appendiċi 5 (bl-użu tal-"metodu sekwenzjali", jiġifieri rigressjoni lineari standard) bl-użu tal-konċentrazzjonijiet medji tal-kampjun mill-faži ta' tisfija. Il-kostant tar-rata ta' tagħlif, I , u d-durata tat-tehid, t , huma parametri magħrufin tal-istudju. C_{food} , il-konċentrazzjoni mkejla medja tas-sustanza tat-test fl-ikel hija varjabbli mkejla fl-istudju. $C_{0,d}$, il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut fi tmeim il-faži ta' tehid, normalment tinkiseb mill-interċetta ta' plott ta' $\ln(\text{konċentrazzjoni})$ vs il-jum tat-tisfija.

L-effiċjenza tal-assimilazzjoni tas-sustanza (a , l-assorbiment tas-sustanza tat-test fl-imsaren) tiġi kkalkolata bħala:

$$a = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.1}]$$

fejn:

$C_{0,d}$ = il-konċentrazzjoni derivata fil-hut fiż-żmien żero tal-faži ta' tisfija (mg kg⁻¹);

▼ **M7**

k_2 = il-kostant totali tar-rata ta' tisfija (mhux ikkoreġut għat-tkabbir) (jum^{-1}),
ikkalkolat skont l-ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 5, Sezzjoni 3;

I = il-kostant tar-rata ta' iġestjoni tal-ikel ($\text{g ikel g}^{-1} \text{hut jum}^{-1}$);

C_{food} = il-konċentrazzjoni fl-ikel (mg kg^{-1} ikel);

t = id-durata tal-perjodu tat-tagħlif (jum)

Madankollu, ir-rata ta' tagħlif, I , użata fil-kalkolu jaf ikollha bżonn tiġi aġġustata għat-tkabbir tal-hut sabiex tagħti effiċjenza tal-assimilazzjoni preċiża, a. F'test li fih il-hut jikber b'mod sinifikanti matul il-fażi ta' tehid (li fiha ma ssir ebda korrezzjoni tal-kwantitajiet ta' għalf sabiex tinżamm ir-rata ta' tagħlif stabbilita), ir-rata ta' tagħlif effettiva hi u tkompli l-fażi ta' tehid sejra tkun inqas minn dik stabbilita, u tirriżulta f'effiċjenza tal-assimilazzjoni “vera” oġġla. (Kun af li dan mhuwiex importanti għall-kalkolu tal-BMF totali peress li t-termini tal- I effettivament jgħibu bejn l-Ekwazzjoni A7.1 u l-Ekwazzjoni A7.4). Ir-rata ta' tagħlif medja kkoreġuta għad-dilwizzjoni tat-tkabbir, I_g , tista' tinkiseb b'bosta modi, iżda mod veloċi u rigoruż huwa li jintuża l-kostant magħruf tar-rata ta' tkabbir (k_g) sabiex jiġu stmati l-piżijiet tal-hut tat-test fil-punti ta' żmien matul il-fażi ta' tehid, jiġifieri:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.2}]$$

fejn

$W_f(t)$ = piż medju tal-hut fil-jum tat-tehid t

$W_{f,0}$ = piż medju tal-hut fil-bidu tal-esperiment

B'dan il-mod (tal-inqas) jista' jiġi stmat il-piż medju tal-hut fl-aħħar jum ta' esponiment ($W_{f,\text{tmim}}$ it-tehid). Peress li r-rata ta' tagħlif kienet stabbilita fuq il-bażi ta' $W_{f,0}$, ir-rata ta' tagħlif effettiva għal kull jum tat-tehid tista' tiġi kkalkolata bl-użu ta' dawn iż-żewġ valuri tal-piż. Imbagħad, ir-rata ta' tagħlif ikkoreġuta għat-tkabbir, I_g ($\text{g ikel g}^{-1} \text{hut jum}^{-1}$), li għandha tintuża minflok I f'każijiet ta' tkabbir rapidu matul il-fażi ta' tehid, tista' tiġi kkalkolata bħala

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{end-of-uptake}}} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.3}]$$

Ladarba tinkiseb l-effiċjenza tal-assimilazzjoni, il-BMF jista' jiġi kkalkolat billi tiġi multiplikata bil-kostant tar-rata ta' tagħlif I (jew I_g , jekk tintuża sabiex tiġi kkalkolata α) u bid-diviżjoni tar-riżultat tal-multiplikazzjoni bil-kostant totali tar-rata ta' tisfija k_2 :

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.4}]$$

Il-fattur ta' bijomanjifikazzjoni kkoreġut għat-tkabbir għandu jiġi kkalkolat bl-istess mod ukoll, bl-użu tal-kostant tar-rata ta' tisfija kkoreġut għat-tkabbir (kif derivat skont is-sezzjoni 7 fl-Appendiċi 5). Mill-ġdid, jekk intużat I_g sabiex tiġi kkalkolata α , din għandha tintuża hawnhekk ukoll minflok I :

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.5}]$$

fejn:

α = l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (l-assorbiment tas-sustanza tat-test fl-imsaren);

k_2 = il-kostant totali tar-rata ta' tisfija (mhux ikkoreġut għat-tkabbir) (jum^{-1}),
ikkalkolat skont l-ekwazzjonijiet fl-Appendiċi 5, Sezzjoni 3;

▼ **M7**

k_{2g} = kostant tar-rata ta' tisfija korrett għat-tkabbir (jum^{-1});

I = il-kostant tar-rata ta' iġestjoni tal-ikel ($\text{g ikel g}^{-1} \text{hut jum}^{-1}$);

In-nofs haġja kkoreġuta għat-tkabbir ($t_{1/2}$) hija kkalkolata kif ġej.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.6}]$$

L-effiċjenza tal-assimilazzjoni tas-sustanza mid-dieta tista' tiġi stmata wkoll jekk ir-residwi tat-tessut jiġu stabbiliti matul il-fażi lineari tal-fażi ta' tehid (bejn jum u tlieta). F'dan il-każ, l-effiċjenza tal-assimilazzjoni tas-sustanza (α) tista' tiġi stabbilita kif ġej:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.7}]$$

Fejn

$C_{fish}(t)$ = konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hut fiż-żmien t (mg kg^{-1} piż niedi).

4. KORREZZJONI GĦAL-LIPIDU

Jekk il-kontenut lipidu tkejjel fl-istess huta bhall-analiżi kimika għall-intervalli ta' kampjunar kollha, il-konċentrazzjonijiet individwali għandhom jiġu kkoreġuti fuq il-bażi ta' lipidu u l-ln(konċentrazzjoni, ikkoreġuta għal-lipidu) tiġi pplotjata kontra t-tisfija (jum) sabiex jinħarġu $C_{0,d}$ u k_2 . Imbagħad, l-effiċjenza tal-assimilazzjoni (Ekwazzjoni A7.1) tista' tiġi kkalkolata fuq bażi lipidu, bl-użu ta' C_{ikel} fuq bażi lipidu (jiġifieri C_{ikel} tiġi multiplikata bil-frazzjoni medja ta' lipidu tal-ikel). Il-kalkolu sussegwenti bl-użu tal-Ekwazzjoni A7.4 u l-Ekwazzjoni A7.5 sejjegħ jagħti l-BMF ikkoreġut għal-lipidu (u kkoreġut għad-dilwizzjoni tat-tkabbir) direttament.

Inkella, il-fattur lipidu medju (w/w) fil-hut u fl-ikel jinkiseb kemm għall-grupp tat-trattament kif ukoll tal-kontroll (għall-ikel u l-hut tal-grupp tal-kontroll, normalment minn dejta mkejla fil-bidu u fi tmiem l-esponiment); għall-hut tal-grupp tat-trattament, normalment minn dejta mkejla fi tmiem l-esponiment biss). F'ċerti studji, il-kontenut lipidu tal-hut jista' jiġi ddid hafna; f'dawn il-każijiet ikun iktar xieraq li tintuża konċentrazzjoni medja ta' lipidu fil-hut tat-test ikkalkolata mill-valuri mkejlin fi tmiem l-esponiment u fi tmiem it-tisfija. B'mod ġenerali, dejta mill-grupp tat-trattament biss għandha tintuża sabiex jinkisbu ż-żewġ frazzjonijiet ta' lipidu.

Il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu (L_c) huwa kkalkolat bħala:

$$L_c = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.8}]$$

fejn L_{hut} u L_{ikel} huma l-frazzjonijiet medji ta' lipidu fil-hut u l-ikel, rispettivamente.

Il-fattur ta' korrezzjoni għal-lipidu jintuża sabiex jiġi kkalkolat il-fattur ta' bijomanijifikazzjoni kkoreġut għal-lipidu (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad [\text{Ekwazzjoni A7.9}]$$

5. EVALWAZZJONI TAD-DIFFERENZI BEJN KONĊENTRAZZJONI MKEJLA FIŻ-ŻMIEN ŻERO ($C_{0,M}$) U KONĊENTRAZZJONI DERIVATA FIL-HIN ŻERO ($C_{0,D}$)

Il-konċentrazzjoni mkejla fiż-żmien zero ($C_{0,m}$) u l-konċentrazzjoni derivata fiż-żmien zero ($C_{0,d}$) għandhom jitqabblu. Jekk huma simili hafna, dan jappoġġja l-mudell tal-ewwel ordni sabiex jinkisbu l-parametri ta' tisfija.

▼ M7

F'ċerti studji, jista' jkun hemm differenza kbira bejn il-valur derivat fiż-żmien zero, $C_{0,d}$, u l-konċentrazzjoni medja mkejla fiż-żmien zero. $C_{0,m}$ (ara l-aħħar bullet tal-paragrafu 159 ta' dan il-metodu ta' ttestjar). F'każ li $C_{0,d}$ tkun ferm inqas minn $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), id-differenza tista' tissuggerixxi l-preżenza ta' ikel miżjud mhux iddiġerit fl-imsaren. Dan jista' jiġi ttestjat b'mod sperimentali billi ssir analiżi separata fuq l-imsaren maqtugħin barra jekk ittiehdu iktar kampjuni (ta' hut shih) u dawn jinħażnu fi tmiem il-fażi ta' tehid. Inkella, jekk test tal-eċċezzjonijiet statistikament validu applikat għar-rigressjoni lineari tal-fażi ta' tisfija jindika li l-ewwel punt ta' kampjunar tat-tisfija huwa elevat b'mod żbaljat, jista' jkun xieraq li ssir ir-rigressjoni lineari sabiex jinkiseb k_2 izda mingħajr l-ewwel punt ta' konċentrazzjoni tat-tisfija. F'dawn il-każijiet, jekk l-inċertezza fir-rigressjoni lineari titnaqqas hafna, u jkun ċar li għet segwita bejn wiehed u iehor il-kinetika tat-tisfija tal-ewwel ordni, jista' jkun xieraq li jintużaw il-valuri li jirriżultaw tal- $C_{0,d}$ u k_2 fil-kalkolu tal-effiċjenza tal-assimilazzjoni. Dan għandu jkun iġġustifikat bis-shih fir-rapport. Huwa possibbli wkoll li fil-fażi ta' tisfija kienet qiegħda topera kinetika mhux tal-ewwel ordni. Jekk dan huwa probabbli (jiġifieri d-dejta trasformata tal-logaritma naturali tidher li ssegwi kurva meta mqabbla mal-plott ta' rigressjoni lineari b'linja dritta), mhuwiex probabbli li l-kalkoli tal- k_2 u $C_{0,d}$ ikunu validi u għandu jifittex il-parir ta' espert tal-bijostatistika.

Jekk $C_{0,d}$ hija ferm ogħla mill-valur imkejjel ($C_{0,d} \gg C_{0,m}$), dan jista' jindika: li s-sustanza ssaffiet malajr hafna (jiġifieri l-punti ta' kampjunar qorbu lejn il-limitu ta' kwantifikazzjoni tal-metodu analitiku fi żmien ferm bikri fil-fażi ta' tisfija, ara s-Sezzjoni 6 ta' hawn taht); li kien hemm devjazzjoni mill-kinetika tat-tisfija tal-ewwel ordni; li r-rigressjoni lineari sabiex jinkisbu k_2 u C_0 fiha l-iżbalji; jew li sehhel problema bil-konċentrazzjonijiet imkejjlin fl-istudju f'ċerti punti ta' żmien tal-kampjunar. F'każijiet bħal dawn, il-plott ta' rigressjoni lineari għandu jiġi skrutinizzat għall-evidenza ta' kampjuni fil-limitu ta' kwantifikazzjoni jew kwazi, għal eċċezzjonijiet u għal kurvatura ovvja (li tissuggerixxi kinetika mhux tal-ewwel ordni), u enfazzzati fir-rapport. Għandha tiġi deskritta u ġġustifikata kwalunkwe rievalwazzjoni sussegwenti tar-rigressjoni lineari sabiex jitjiebu l-valuri stmati. Jekk tiġi osservata devjazzjoni kbira mill-kinetika tal-ewwel ordni, mhuwiex probabbli li l-kalkoli tal- k_2 u $C_{0,d}$ ikunu validi u għandu jifittex il-parir ta' espert tal-bijostatistika.

6. GWIDA GĦAL SUSTANZI TAT-TEST B'TISFIJA VELOĊI HAFNA

Kif ġie diskuss fil-paragrafu 129 tal-metodu ta' ttestjar, ċerti sustanzi jistgħu jissaffew tant malajr li ma jkunux jistgħu jinkisbu konċentrazzjoni affidabbli taż-żmien zero, $C_{0,d}$, u k_2 għaliex fil-kampjuni ferm bikrin fil-fażi ta' tisfija (jiġifieri mit-tieni kampjun ta' tisfija 'l quddiem), is-sustanza effettivament ma tibqax tikejjel (konċentrazzjonijiet irrapportati fil-limitu tal-kwantifikazzjoni). Din is-sitwazzjoni għet osservata fir-ringtest imwettaq b'appoġġ ta' dan il-metodu ta' ttestjar bil-benzo[a]piren, u għet iddokumentata fir-rapport ta' validazzjoni għall-metodu. F'dawn il-każijiet, ma tistax issir rigressjoni lineari affidabbli, u aktarx li din tagħti stima għolja wisq tas- $C_{0,d}$, li tirriżulta f'effiċjenza tal-assimilazzjoni apparenti ferm ikbar minn 1. Huwa possibbli li tiġi kkalkolata stima konservattiva tal- k_2 u BMF ta' "limitu superjuri" f'dawn il-każijiet.

Bl-użu ta' dawk il-punti ta' dejta tal-fażi ta' tisfija fejn tkejjel konċentrazzjoni, sa u inkluża l-ewwel konċentrazzjoni "mhux individwata" (konċentrazzjoni stabbilita fil-limitu tal-kwantifikazzjoni), rigressjoni lineari (bl-użu tad-dejta dwar il-konċentrazzjoni trasformata tal-logaritma naturali kontra ż-żmien) sejra tagħti stima tal- k_2 . Għal dawn it-tipi ta' każijiet, aktarx li dan sejjer jinvolti żewġ punti ta' dejta biss (eż. jiemi 1 u 2 tal-kampjun tat-tisfija) u mbagħad ikun jista' jiġi stmat k_2 bl-użu tal-Ekwazzjoni A5.22 fl-Appendiċi 5.

▼ **M7**

Din l-istima tal- k_2 tista' tintuża sabiex tiġi stmata effiċjenza tal-assimilazzjoni skont l-ekwazzjoni A7.1, billi jiġi sostitwit il-valur ta' $C_{0,d}$ fl-ekwazzjoni mal-koncentrazzjoni mkejla fiż-żmien żero ($C_{0,m}$) f'każijiet fejn $C_{0,d}$ tkun stmata b'mod ċar bħala ferm oghla minn dak li seta' jinkiseb fit-test. Jekk $C_{0,m}$ ma setgħetx titkejjel, għandu jintuża l-limitu ta' detezzjoni fit-tessut tal-ħut. Jekk, f'ċerti każijiet, dan jagħti valur ta' $\alpha > 1$, l-effiċjenza tal-assimilazzjoni hija supponuta bħala 1 bħala "l-agħar każ".

Imbagħad il-BMF_K massimu jista' jiġi stmat bl-użu tal-Ekwazzjoni A7.4, u għandu jiġi kkwotat bħala valur "ferm inqas minn" ($<<$). Pereżempju, għal studju mwettaq b'rata ta' tagħlif ta' 3 % u nofs ħajja tat-tisfija inqas minn 3 ijiem, u α "l-agħar każ" ta' 1, il-BMF_K aktarx li jkun inqas b'madwar 0.13. Fid-dawl tal-iskop ta' din l-istima u l-fatt li l-valuri, fl-għamla tagħhom, sejrini ikunu konservattivi, ma hemmx bżonn li jiġu kkoreġuti għad-dilwizzjoni tat-tkabbir jew il-kontenut lipidu tal-ħut u l-ikel.

▼ M7

Appendiċi 8

APPROĊĊI SABIEX JIĠU STMATI L-BCFS TENTATTIVI MID-DEJTA MIĠBURA FL-ISTUDJU TAL-ESPONIMENT DJETETIKU

Il-metodu djetetiku huwa inkluż f'dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li fil-prattika ma jistghux jiġu ttestjati bl-użu tal-metodu tal-esponiment milwiem. Il-metodu tal-esponiment milwiem jagħti fattur ta' bijokonċentrazzjoni, filwaqt li l-metodu djetetiku jwassal direttament għal informazzjoni dwar il-potenzjal ta' bijomanjifikazzjoni tat-tagħlif. F'hafna reġimi dwar is-sikurezza tas-sustanza kimika, hemm bżonn ta' informazzjoni dwar il-bijokonċentrazzjoni akkwatika (pereżempju fil-valutazzjoni tar-riskju u s-Sistema ta' Armonizzazzjoni Globalizzata tal-Klassifikazzjoni). B'hekk, hemm bżonn li tintuża d-dejta ġġenerata fi studju djetetiku sabiex jiġi stmat fattur ta' bijokonċentrazzjoni li huwa paragonabbli għal testijiet imwettqin skont il-metodu tal-esponiment milwiem⁽¹⁾. Din is-sezzjoni tixtarr approċċi li jistgħu jiġu segwiti biex isir hekk, filwaqt li tirrikonoxxi n-nuqqasijiet li huma inerenti fl-istimi.

L-istudju djetetiku jkejjel it-tisfija sabiex jagħti kostant tar-rata ta' tisfija, k_2 . Jekk ikun jista' jiġi stmat kostant tar-rata ta' tehid bid-dejta disponibbli għas-sitwazzjoni fejn il-hut kien espost għas-sustanza tat-test mill-ilma, ikun jista' jiġi stmat BCF kinetiku.

L-istima ta' kostant tar-rata ta' tehid għall-esponiment mill-ilma ta' sustanza tat-test hija msejsa fuq hafna suppożizzjonijiet, u lkoll sejr in jikkontribwixxu għall-inċertezza tal-istima. Barra minn hekk, dan l-approċċ sabiex jiġi stmat BCF jassumi li r-rata totali ta' tisfija (inklużi fatturi kontributorji bħad-distribuzzjoni fil-ġisem u l-proċessi ta' tisfija individwali) huwa indipendenti mit-teknika ta' esponiment użata sabiex jiġi prodott toqol fil-ġisem tas-sustanza tat-test.

Is-suppożizzjonijiet ewlenin inerenti fl-approċċ tal-istima jistgħu jingabru fil-qasir kif ġej.

It-tisfija wara t-tehid djetetiku hija l-istess bħat-tisfija wara l-esponiment milwiem għal sustanza partikolari

It-tehid mill-ilma jsegwi l-kinetika tal-ewwel ordni

Skont il-metodu użat sabiex jiġi stmat it-tehid:

- it-tehid jista' jiġi korrelatat mal-piż tal-hut waħdu
- it-tehid jista' jiġi korrelatat mal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanza waħdu
- it-tehid jista' jiġi korrelatat ma' tahlita tal-piż tal-hut mal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma tas-sustanza
- fatturi li jistgħu jaffettwaw it-tehid fi studju ta' esponiment milwiem fil-prattika bħall-bijodisponibbiltà tas-sustanza, l-adsorbiment mal-apparat, id-daqs molekulari, eċċ. f'tit li xejn għandhom effett
- u, b'mod kruċjali:

Id-database ("sett ta' tahrig" użata sabiex jiġi żviluppat il-metodu ta' stima tat-tehid tirrappreżenta s-sustanza kkunsidrata

Bosta pubblikazzjonijiet fit-tagħrif disponibbli haġu ekwazzjonijiet li rabtu t-tehid mill-ilma fil-hut permezz tal-garġi mal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma ta' sustanza, il-piż tal-hut (1) (2) (3) (4), il-volum u/jew il-kontenut lipidu, il-permeazzjoni/id-diffużjoni tal-membrana (5) (6), il-volum ta' ventilazzjoni tal-hut (7) u b'approċċ tal-bilanċ tal-fugaċità/massa (8) (9) (10). Fi Crookes & Brooke tingħata valutazzjoni dettaljata ta' dawn il-metodi f'dan il-kuntest (11).

⁽¹⁾ F'ambjenti selvaġġi, ir-rotta li twassal għall-ikbar esponiment f'ambjenti milwiema aktarx li ssehh permezz ta' ingestjoni għal sustanzi ferm idrofobiċi u b'hekk il-BCF stmat mhuwiex strettament rappreżentattiv tat-tali potenzjal ta' bioakkumulazzjoni tas-sustanza.

▼ M7

Pubblikazzjoni minn Barber (12) iffokata fuq l-immudellar tal-bijoakkumulazzjoni permezz tat-tehid djetetiku hija siewja wkoll f'dan il-kuntest peress li tink-ludi kontribuzzjonijiet mill-mudelli tar-rata ta' tehid mill-gargi. Sezzjoni tad-dokument ta' sfond għall-protokoll djetetiku tal-2004 (13) kienet iddedikata għal dan l-aspett ukoll.

Hafna minn dawn il-mudelli jidhru li nkisbu bl-użu ta' databases limitati. Għal mudelli li għalihom hemm disponibbli d-dettalji tad-database użata sabiex jinbena l-mudell, jidher li t-tipi ta' sustanzi użati spiss ikunu ta' struttura jew klassi simili (f'termini ta' funzjonalità, eż. organoklori). Dan iżid mal-inċertezza fl-użu ta' mudell li jbassar kostant tar-rata ta' tehid għal tip ta' sustanza differenti, minbarra kunsiderazzjonijiet speċifiċi għat-test bħal speċi, temperatura, eċċ.

Reviżjoni tat-tekniki disponibbli (11) weriet li ebda metodu wiehed ma huwa "iżgħir korrett" mill-oħrajn. Għalhekk, għandha tingħata ġustifikazzjoni ċara għall-mudell użat. Meta jkun hemm bosta metodi disponibbli li jista' jiġi ġġustifikat l-użu tagħhom, jista' jkun prudenti li jiġu ppreżentati bosta stimi tal- k_1 (u b'hekk il-BCF) jew medda ta' valuri tal- k_1 (u l-BCF) skont bosta metodi għall-istima tat-tehid. Madankollu, minhabba d-differenzi fit-tipi ta' mudelli u s-settijiet ta' dejta użati sabiex jiġu żviluppati, it-tehid ta' valur mill-istimi derivati b'mod differenti ma jkunx xieraq.

Ċerti riċerkaturi stipulaw li l-istimi tal-BCF ta' din ix-xorta jehtieġu korrezzjoni tal-bijodisponibilità sabiex jitqies l-adsorbiment ta' sustanza għal karbonju organiku dissolt (DOC) f'kundizzjonijiet tal-esponiment milwiem, sabiex l-istimi tingħeb konformi mar-risultati minn studji tal-esponiment milwiem (eż. (13) (14)). Madankollu, din il-korrezzjoni ma tistax tkun xieraq minhabba l-livelli baxxi ta' DOC mehtieġa fi studju tal-esponiment milwiem għal stima tal-"aġġar każ" (jiġifieri proporzjon tas-sustanza bijodisponibbli għal sustanza kif imkejla fis-soluzzjoni). Għal sustanzi ferm idrofobiċi, it-tehid fil-gargi jista' jsir limitat minhabba r-rata ta' diffużjoni passiva qrib il-wiċċ tal-gargi; f'dan il-każ, huwa possibbli li l-korrezzjoni tista' tkun tqis dan l-effett minflok għal dak li kienet imfassla għalih.

Huwa rakkomandat li jiġi ffokat fuq il-metodi li jehtieġu inputs li għalihom sejjer ikun hemm dejta disponibbli għal sustanzi ttestjati skont l-istudju djetetiku deskritt hawn (jiġifieri log K_{OW} , piż tal-hut). Jistgħu jiġu applikati metodi oħrajn li jehtieġu inputs iktar kumplessi, iżda dawn jistgħu jkunu jehtieġu kejljet addizzjonali fit-test jew għarfien dettaljat dwar is-sustanza tat-test jew l-ispeċi tal-hut li jaf ma jkunux għad-dispożizzjoni faċilment. Barra minn hekk, l-għażla tal-mudell tista' tkun influwenzata mil-livell ta' validazzjoni u d-dominju ta' applikabilità (ara (11) għal reviżjoni u paragon ta' metodi differenti).

Ta' min jiftakar li l-istima tal- k_1 li tirriżulta, u l-BCF stmat, huma inċerti u jista' jkollhom bżonn jiġu ttrattati f'approċċ tal-piż tal-evidenza flimkien mal-BMF u l-parametri tas-sustanza (eż. id-daqs tal-molekoli) għal stampa sħiħa tal-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni ta' sustanza. L-interpretazzjoni u l-użu ta' dawn il-parametri jistgħu jiddependu mill-qafas regolatorju.

TAGHRIF

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼ **M7**

- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.
- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. PROVATA' L-IŻVILUPP FIŻ-ŻGHOŻIJA TAL-HUT

1. METODU

Dan il-metodu tal-prova tat-tossicità fl-iżvilupp huwa replika ta' l-OECD TG 215 (2000).

1.1. DAHLA

Din il-prova hija ddisinjata biex isir stima ta' l-effetti ta' espożizzjoni fit-tul għall-kimiċi fuq l-iżvilupp ta' hut żagħżuġh. Hija bbażata fuq metodu, żviluppat u ppruvat permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (1)(2) fl-Unjoni Ewropea, biex issir stima ta' l-effetti tal-kimiċi fuq l-iżvilupp tal-hut żagħżuġh ta' l-ispeċi fil-generu ta' Salamun (*Oncorhynchus mykiss* – rainbow trout) taht kondizzjonijiet flow-through. Speċi ohra li huma ddokumentati tajjeb jistgħu jintużaw. Per eżempju, inkisbet esperjenza minn provi ta' l-iżvilupp biż-zebrafish (*Danio rerio*) ⁽¹⁾ (3)(4) u bir-icefish (medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Ara wkoll id-Dahla Ġenerali l-Parti Ċ.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tagħti effett osservat (LOEC): hija l-iktar konċentrazzjoni baxxa ta' sustanza tal-prova li għet ippruvata li fiha s-sustanza hija osservata li għandha effett sinifikattiv (fi $p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha li huma aktar għoljin mil-LOEC għandu jkollhom effett perikoluż daqs jew aktar minn dawk osservati fil-LOEC.

Konċentrazzjoni li ma tagħti l-ebda effett osservat (NOEC): hija l-konċentrazzjoni tal-prova immedjament taht il-LOEC.

EC_x: f'dan il-metodu tal-prova hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova li tikkaguna varjazzjoni fir-rata ta' żvilupp tal-hut ta' x % meta mqabbla mal-kontrolli.

Rata tat-tagħbija: hija l-piż imxarrab ta' hut f'volum ta' ilma.

Densità tal-hżin: hija n-numru ta' hut f'volum ta' ilma.

Rata ta' żvilupp speċifika għall-huta individwali: tesprimi r-rata ta' żvilupp ta' huta individwali bbażata fuq il-piż inizjali tagħha.

Rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank: tesprimi r-rata ta' żvilupp medja ta' popolazzjoni go tank għal konċentrazzjoni waħda.

Rata ta' żvilupp pseudo speċifika: tesprimi r-rata ta' żvilupp individwali mqabbla mal-piż inizjali medju tal-popolazzjoni tat-tank.

⁽¹⁾ Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. PRINĊIPJUTAL-METODU TAL-PROVA

Hut żagħżugh f'fażi ta' żvilupp esponenzali huwa mqiegħed, wara li jintiżen, f'kompartimenti tal-prova u huwa espost għal firxa ta' konċentrazzjonijiet sotto-letali tas-sustanza tal-prova mahlula fl-ilma preferibbilment taħt kondizzjonijiet flow-through, jew, jekk dan mhux possibbli, taħt kondizzjonijiet semistatiċi (ta' tiġdid statiku) xierqa. It-tul ta' żmien tal-prova huwa ta' 28 jum. Il-hut huwa mitmugħ kuljum. Ir-razzjon ta' l-ikel huwa bbażat fuq il-piżijiet inizjali tal-hut u jista' jerga' jiġi kkalkolat wara 14-il jum. Fit-tmiem tal-prova, il-hut jerga' jintiżen. L-effetti fuq ir-rati ta' żvilupp huma analizzati bl-użu ta' mudell tar-rigressjoni sabiex issir stima tal-konċentrazzjoni li tikkaġuna varjazzjoni fir-rata ta' żvilupp ta' x %, i.e. EC_x (eż. EC_{10} , EC_{20} , jew EC_{30}). Alternattivament, id-data tista' titqabbel mal-valuri tal-kontroll sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni l-aktar baxxa li tagħti effett osservat (LOEC) u għalhekk il-konċentrazzjoni li ma tagħti l-ebda effett osservat (NOEC).

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAL-PROVA

Ir-riżultati tal-prova ta' tossiċità akuta (ara l-metodu tal-prova Ċ1). Dan jimplika li s-solubilità fl-ilma u l-pessjoni tal-fwar tas-sustanza tal-prova huma magħrufa u li metodu analitiku u ta' min joqgħod fuqu għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tal-prova bi preċiżjoni u b'limitu ta' osservazzjoni magħrufa u rrapportati huwa disponibbli.

Informazzjoni utli tinkludi l-formula strutturali, purità tas-sustanza, stabbiltà fl-ilma u fid-dawl, pK_a , P_{ow} u riżultati tal-prova għal bijo-degradabilità fil-pront (ara l-metodu tal-prova Ċ4).

1.5. VALIDITÀ TAL-PROVA

Sabiex il-prova tkun valida għandhom japplikaw il-kondizzjonijiet li ġejjin:

- il-mortalità fil-kontroll(i) ma jistax jeċċedi l-10 % fit-tmiem tal-prova,
- il-piż medju tal-hut fil-kontroll(i) għandu jkun żdied biżżejjed biex jippermetti l-osservazzjoni tal-varjazzjoni minima tar-rata ta' żvilupp li hi meqjusa bħala sinifikattiva. Prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (2) uriet li għal hut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout) il-piż medju ta' hut fil-kontrolli żdied mill-inqas bin-nofs (i.e. 50 %) tal-piż inizjali medju tagħhom fmedda ta' 28 jum, eż. piż inizjali: 1 g/hut (= 100 %), piż finali wara 28 jum: > 1,5 g/hut ($\geq$ 150 %),
- il-konċentrazzjoni ta' ossiġnu mahlul kienet mill-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni ta' l-arja (ASV) matul il-prova,
- it-temperatura ta' l-ilma m'għandhiex tvarja b'aktar minn ± 1 °C bejn il-kompartimenti tal-prova fxi hin partikolari matul il-prova u għandha tinżamm f'firxa ta' 2 °C fil-firxiet ta' temperatura speċifikati għall-ispeċi tal-prova (l-Appendiċi 1).

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-PROVA

1.6.1. Apparat

Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

- metri ta' l-ossiġnu u tal-pH;

▼B

- tagħmir għad-determinazzjoni ta' l-ebusija u l-alkalinità ta' l-ilma;
- tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment moniturjar kontinwu;
- tankijiet magħmula minn materjal li huwa inert għall-kimika u ta' kapacità adattata skond it-tagħbija u d-densità tal-ħzin rakkomandati (ara it-taqsima 1.8.5 u l-Appendiċi 1);
- bilanċ preċiż kif xieraq (i.e. preċiż sa $\pm 0,5$ %).

1.6.2. Ilma

Kull ilma li fih l-ispeċi tal-prova turi sopravivenza fit-tul u żvilupp adattat jista' jintuża bħala ilma tal-prova. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tal-prova. Il-pH ta' l-ilma għandu jkun fil-firxa ta' 6,5 sa 8,5, imma matul prova partikolari għandu jkun f'firxa ta' $\pm 0,5$ unitajiet tal-pH. Ebusija oghla minn 140 mg/l (bħala CaCO_3) hija rakkomandata. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma għat-tahlit ma jaffettwax ir-riżultati tal-prova b'mod eċċessiv (per eżempju billi jbidel il-karattru generali tas-sustanza tal-prova), għandhom jittiehdu kampjuni f'intervalli għall-analiżi. Tiqjis ta' metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd u Ni), anjoni u katjoni maġġuri (eż. Ca, Mg, Na, K, Cl u SO_4), pesticidi (eż. pesticidi ta' l-organofosforu totali u ta' l-organoklorin totali), karbonju organiku totali u solidi f'forma ta' suspensjoni għandu jsir, per eżempju, kull tliet xhur fejn l-ilma għat-tahlit huwa magħruf li hu ta' kwalità relattivament kostanti. Jekk il-kwalità ta' l-ilma intweriet li kienet kostanti matul ta' l-inqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jsiru inqas spiss u l-intervalli jiġu estiżi (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma għat-tahlit li huwa aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2.

1.6.3. Soluzzjonijiet tal-prova

Soluzzjonijiet tal-prova tal-konċentrazzjonijiet magħżula huma preparati billi soluzzjoni tal-ħzin tiġi mħallta ma' l-ilma.

Is-soluzzjoni tal-ħzin għandha preferibbilment tkun preparata sempliċement billi s-sustanza tal-prova tiġi mħallta jew aġitata fl-ilma għat-tahlit bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. thawwid jew ultrasonikazzjoni). Kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità) jistgħu jintużaw biex tinkiseb soluzzjoni konċentrata tal-ħzin adattata.

L-użu ta' solventi jew ta' aġenti li jiffaċilitaw is-solubilità (dispersants) jista' jkun mehtieg f'xi każijiet biex tkun magħmula soluzzjoni tal-ħzin ta' konċentrazzjoni adattata. Eżempji ta' solventi adattati huma aċeton, etanol, metanol, dimethylsulfoxide, dimethylformamide u triethyleneglycol. Eżempji ta' aġenti li jiffaċilitaw is-solubilità (dispersants) adattati huma Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % u HCO-40. Attenzjoni għandha tittiehed meta jkun qegħad jintużaw aġenti li huma faċilment bijodigradabbli (eż. aċeton) u/jew komposti li huma volatili hafna għax dawn jistgħu jikkawżaw problemi bit-tkattir ta' batterja fil-provi flow-through. Meta jintuża aġent li jiffaċilita s-solubilità dan m'għandux jkollu effetti sinifikattivi fuq l-iżvilupp tal-hut u l-inqas effetti negattivi vizibbli fuq il-hut żagħżuġ kif svelat b'kontroll li juża s-solvent biss.

▼B

Għal provi flow-through, hija meħtieġa sistema li kontinwament tqassam u tħallat bl-ilma s-soluzzjoni tal-ħzin tas-sustanza tal-prova (eż. pompa li tkejjel u tqassam bil-miter, tagħmir li jhallat is-sustanza ma' l-ilma b'mod proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) biex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet lill-kompartimenti tal-prova. Ir-rati ta' ċaqliq tas-soluzzjonijiet tal-ħzin u ta' l-ilma għat-tahlit għandhom jiġu kkontrollati f'intervalli, preferibbilment ta' kuljum, matul il-prova u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul il-prova. Prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (2) uriet li, għal hut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), frekwenza tat-tneħħija ta' l-ilma matul il-prova ta' 6 litri/g ta' hut/jum hija aċċettabbli (ara it-taqsima 1.8.2.2).

Għal provi semi-statiċi (ta' tiġdid), il-frekwenza ta' tiġdid tal-likwidu tiddependi fuq l-istabbiltà tas-sustanza tal-prova, imma tiġdid ta' kuljum ta' l-ilma huwa rakkomandat. Jekk, minn provi ta' stabbiltà preliminarji (ara t-taqsima 1.4), il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova ma tkunx stabbli (i.e. barra mill-firxa ta' 80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali jew taqa' inqas minn 80 % tal-konċentrazzjoni inizjali meqjusa) matul il-perjodu ta' tiġdid, għandha tingħata konsiderazzjoni għall-użu ta' prova flow-through.

1.6.4. **Għażla ta' l-ispeċi**

L-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (*Oncorhynchus mykiss* – rainbow trout) huwa l-ispeċi rakkomandat għal din il-prova peress li hafna mill-esperjenza kienet akkwistata minn prova permezz ta' programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) b'dan l-ispeċi (1) (2). Madankollu, speċi oħra li huma ddokumentati tajjeb jistgħu jintużaw imma l-proċedura tal-prova għandha mnejn ikollha tiġi adattata biex tipprovi kondizzjonijiet tal-prova adattati. Per eżempju, esperjenza hija wkoll disponibbli biż-zebrafish (*Danio rerio*) (3) (4) u r-ricefish (medaka, *Oryzias latipes*) (5) (6) (7). Ir-raġuni fundamentali għall-għażla ta' l-ispeċi u tal-metodu esperimentali għandhom jiġu rrapportati f'dan il-każ.

1.6.5. **Żamma tal-hut**

Il-hut tal-prova għandu jiġi magħżul minn popolazzjoni ta' stokk wiehed, preferibbilment mill-istess wild, li tkun ilha miżmuma għal mill-inqas ġimagħtejn qabel il-prova taht kondizzjonijiet ta' kwalità ta' l-ilma u ta' illuminazzjoni simili għal dawk użati fil-prova. Għandhom jingħataw razżjon minimu ta' ikel ta' 2 % tal-piż tal-ġisem kuljum u preferibbilment ta' 4 % tal-piż tal-ġisem kuljum matul il-perjodu taż-żamma u matul il-prova.

Wara perjodu ta' stabbilizzazzjoni ta' 48 siegħa, l-imwiet jiġu reġistrati u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

- imwiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-grupp intier jiġi mwarrab,
- imwiet ta' bejn il-5 % u l-10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem addizzjonali, jekk aktar minn 5 % mortalità matul it-tieni sebat ijiem, il-grupp intier jiġi mwarrab,
- imwiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: aċċetta l-grupp.

Il-hut m'għandux jirċievi trattament għall-mard fil-ġimagħtejn ta' qabel il-prova, jew matul il-prova.

▼B**1.7. DISINN TAL-PROVA**

L-“ippjanar tal-prova” huwa relatat ma' l-ghażla tan-numru u ta' l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tal-prova, in-numru ta' rankijiet għal kull livell ta' konċentrazzjoni u n-numru ta' ħut f'kull tank. Idealment, id-disinn tal-prova għandu jkun magħżul skond:

- l-ghan ta' l-istudju;
- il-metodu ta' analizi ta' l-istatistika li ser jintuża;
- id-disponibbiltà u l-ispiza tar-rizorsi sperimentali.

Il-prospett ta' l-ghan għandu, jekk hu possibbli, jispeċifika l-qawwa ta' l-istatistika li fiha ammont partikolari ta' differenza fid-daqs (eż. fir-rata ta' żvilupp) huwa mehtieg biex jiġi osservat jew, alternattivament, il-preċiżjoni li biha l-EC_x (eż. fejn $x = 10, 20$, jew 30 , u preferibbilment mhux inqas minn 10) hija mehtieġa biex tkun stmata. Mingħajr dan, ma tistax tinghata preskrizzjoni ferma tad-daqs ta' l-istudju.

Huwa importanti li jingharaf li d-disinn li huwa l-aħjar (jagħmel l-aħjar użu mir-rizorsi) għall-użu ma' metodu wiehed ta' analizi ta' l-istatistika mhuwiex neċessarjament l-ottimu għall-użu ma' iehor. Id-disinn rakkomandat għall-istima ta' LOEC/NOEC għalhekk ma jkunx l-istess bħal dak rakkomandat għal analizi bir-rigressjoni.

F'għadd kbir ta' każijiet, analizi bir-rigressjoni hija preferibbli minn analizi tal-varjanza, għal raġunijiet iddiskutati minn Stephan u Rogers (8). Madankollu, meta ma jinstab l-ebda mudell tar-rigressjoni adattat ($r_2 < 0,9$) in-NOEC/LOEC għandhom jintużaw.

1.7.1. Disinn għal analizi bir-rigressjoni

Il-konsiderazzjonijiet importanti fid-disinn tal-prova li ser tiġi analizata bir-rigressjoni huma:

- Huwa mehtieg li l-konċentrazzjoni li tagħti effett (eż. EC₁₀, ₂₀, ₃₀) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet li fiha l-effett tas-sustanza tal-prova huwa ta' interess, ikunu koperti mill-konċentrazzjonijiet inkluzi fil-prova. Il-preċiżjoni li biha jistgħu jsiru l-istimi tal-konċentrazzjonijiet li jagħtu effett, tkun l-aqwa meta l-konċentrazzjoni li tagħti effett tkun fin-nofs tal-firxa ta' konċentrazzjonijiet ppruvati. Prova preliminarja biex tinstab il-firxa tista' tkun ta' għajjnuna biex jintgħażlu l-konċentrazzjonijiet tal-prova xierqa.
- Biex ikun possibbli li jsir mudellar sodisfaċenti ta' l-istatistika, il-prova għandha tinkludi mill-inqas tank tal-kontroll wiehed u hames tankijiet addizzjonali b'konċentrazzjonijiet differenti. Fejn xieraq, meta jintuza aġent li jiffaċilità s-solubbiltà, barra mis-serje tal-prova għandu jsir kontroll wiehed li jkun jinstab fih dan l-aġent fl-iktar konċentrazzjoni għolja li giet ppruvata (ara t-taqsimiet 1.8.3 u 1.8.4).
- Serje ġeometrika jew logaritmika xierqa (9) (ara l-Appendiċi 3) tista' tintuża. L-ispazjar logaritmiku tal-konċentrazzjoni tal-prova għandha tkun preferuta.

▼B

- Jekk aktar minn sitt tankijiet huma disponibbli, it-tankijiet addizzjonali għandhom jew jintużaw biex jipprovdu replikazzjoni jew ikunu distribwiti mal-firxa tal-koncentrazzjonijiet sabiex jiffaċilitaw spazjar eqreb tal-livelli. Kemm il-wahda kif ukoll l-oħra minn dawn il-miżuri huma ugwalment mixtieqa.

1.7.2. **Disinn għall-istima ta' NOEC/LOEC bl-użu ta' l-analizi tal-varjanza (ANOVA)**

Preferibbilment għandu jkun hemm tankijiet replikati f'kull konċentrazzjoni, u l-analizi ta' l-istatistika għandha tkun fil-livell tat-tank (10). Mingħajr tankijiet replikati, ma tista' ssir l-ebda konċessjoni għall-varjabilità bejn it-tankijiet aktar minn dik dovuta għall-hut individwali. Madankollu, l-esperjenza uriet (11) li l-varjabilità bejn it-tankijiet kienet żgħira hafna meta mqabbla mal-varjabilità got-tank (i.e. bejn il-hut) fil-każ eżaminat. Għalhekk alternattiva li hi relattivament aċċettabbli hi li ssir analizi ta' l-istatistika fil-livell tal-hut individwali.

Konvenzjonalment, jintużaw mill-inqas hames konċentrazzjonijiet tal-prova f'serje ġeometrika b'fattur li preferibbilment ma jeċċedi it-3,2.

Ġeneralment, meta jsiru provi b'tankijiet replikati, in-numru ta' tankijiet tal-kontroll replikati u għalhekk in-numru ta' hut għandu jkun id-doppju tan-numru f'kull wahda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova, li għandhom ikunu ta' daqs ugwali (12) (13) (14). Min naħa l-oħra, fin-nuqqas ta' tankijiet replikati, in-numru ta' hut fil-grupp tal-kontroll għandu jkun l-istess bħan-numru f'kull wahda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova.

Jekk l-ANOVA għandha tkun bbazata fuq it-tankijiet minflok fuq il-hut individwali (li jkun jinvolvi jew l-immarkar individwali tal-hut jew l-użu ta' rati ta' żvilupp "psewdo" speċifiċi (ara t-taqsim 2.1.2)), hemm il-htieġa li jkun hemm biżżejjed replikazzjoni ta' tankijiet biex id-devjazzjoni standard ta' "tankijiet fil-konċentrazzjonijiet" tkun tista' tiġi determinata. Dan ifisser li l-gradi ta' helsien għall-izbalji fl-analizi tal-varjanza għandhom ikunu mill-inqas 5 (10). Jekk il-kontrolli biss huma replikati, hemm il-periklu li l-varjabilità fl-izbalji tkun preġudikata għax għandha mnejn tiżdied skond il-valur medju tar-rata ta' żvilupp li ssemmiet. Peress li r-rata ta' żvilupp x'aktarx tonqos meta l-konċentrazzjoni tiżdied, dan ikollu tendenza li jwassal għal stima oghla tal-varjabilità.

1.8. **PROCEDURA**

1.8.1. **Għażla u użin tal-hut tal-prova**

Huwa importanti li l-varjazzjoni fil-piż tal-hut fil-bidu tal-prova tiġi mnaqqsa kemm jista' jkun. Firxiet ta' daqs adattati għall-ispeċi differenti li huma rakkomandati għall-użu f'din il-prova jingħataw fl-Appendiċi 1. Għall-grupp kollu ta' hut użat fil-prova, il-firxa ta' piżijiet individwali fil-bidu tal-prova għandha idealment tinżamm fil- $\pm$ 10 % tal-piż medju aritmetiku u, f'kull każ, m'għandux jeċċedi l-25 %. Huwa rak komandat li sottomkampjun ta' hut jiġi peżat qabel il-prova sabiex issir stima tal-piż medju.

▼B

L-ikel għandu jinżamm mill-popolazzjoni tal-ħżin għal 24 siegħa qabel ma tidba l-prova. Il-ħut għandu imbagħad jintgħażel saltwar-jament. Bl-użu ta' anestetiku ġenerali (eż. soluzzjoni fl-ilma ta' 100 mg/l tricaine methane sulphonate (MS 222) newtralizzata biż-żieda ta' żewġ partijiet bikarbonat tas-sodju għal kull parti ta' MS 222), il-ħut għandu jintiżen individwalment bħala piż imxarrab (ixxugat) bil-preċiżjoni mniżżla fl-Appendiċi 1. Dawk il-ħut li l-piż tagħhom ikun fil-firxa maħsuba għandhom jinżammu u għandhom imbagħad jiġu mqassma b'mod saltwarju bejn il-reċipjenti tal-prova. Il-piż imxarrab totali tal-ħut f'kull reċipjent tal-prova għandu jiġi reġistrat. L-użu ta' anestetici u bl-istess mod l-immaniġġjar tal-ħut (inkluż l-ixxugar u l-użin) jista' jikkaguna tensjoni u ħsara lill-ħut żagħżuġh, b'mod partikolari lill dawk l-ispeċi ta' daqs żgħir. Għalhekk l-immaniġġjar ta' ħut żagħżuġh għandu jsir bl-akbar attenzjoni biex jiġi evitat li l-annimali tal-prova tinholqilhom tensjoni u ħsara.

Il-ħut jerggħu jintiżnu fil-jum 28 tal-prova (ara t-taqsim 1.8.6). Madankollu, jekk ikun meqjus li hu mehtieg li jerga' jiġi kkalkolat ir-razzjon ta' l-ikel, il-ħut jista' jerga' jintiżen fil-jum 14 tal-prova (ara t-taqsim 1.8.2.3). Metodu ieħor bħall-metodu fotografiku jista' jintuza biex jiġi stabbilit it-tibdil fid-daqs tal-ħut li fuq il-bażi tiegħu r-razzjonijiet ta' l-ikel jistgħu jiġu aġġustati.

1.8.2. **Kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**

1.8.2.1. *Tul ta' żmien*

It-tul ta' żmien tal-prova hi ≥ 28 jum.

1.8.2.2. *Rati tat-tagħbija u densitjiet tal-ħżin*

Huwa importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-ħżin huma xierqa għall-ispeċi tal-prova użati (ara l-Appendiċi 1). Jekk id-densità tal-ħżin tkun għolja wisq, allura jkun hemm tensjoni minhabba fl-iffullar esagerat li jirriżulta frati ta' żvilupp imnaqqa u possibbilment fil-mard. Jekk tkun baxxa wisq, tista' tikkaguna mġieba territorjali li tista' wkoll taffettwa l-iżvilupp. F'kull każ, ir-rata tat-tagħbija għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex koncentrazzjoni ta' ossiġnu mahlul ta' mill-inqas 60 % ASV tista' tinżamm mingħajr arjazzjoni. Programm komparattiv bejn il-laboratorji (ring test) (3) wera li, għall-ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), rata tat-tagħbija ta' 16 il-huta ta' dan l-ispeċi ta' 3-5 g f'volum ta' 40-litru hija aċċettabbli. Il-frekwenza rakkomandata għat-tnehhija ta l-ilma matul il-prova hija ta' 6 litri/g ta' ħut/jum.

1.8.2.3. *Tmigh*

Il-ħut għandhom jiġu mitmugħa b'ikel xieraq (l-Appendiċi 1) b'rata suffiċjenti li tikkaguna rata ta' żvilupp aċċettabbli. Għandha tittiehed attenzjoni biex jiġi evitat l-iżvilupp ta' mikrobi u d-dardir ta' l-ilma. Għall-ħut ta' l-ispeċi fil-ġeneru ta' Salamun (rainbow trout), rata ta' 4 % tal-piż tagħom tal-ġisem kuljum għandha x'aktarx tissodisfa dawn il-kondizzjonijiet (2)(15)(16)(17). Ir-razzjon ta' kuljum jista' jitqassam f'żewġ porzjonijiet indaqs u jingħata lill-ħut f'żewġ ikliet kuljum, imbegħdin b'ta' l-inqas hames sigħat. Ir-razzjon huwa bbażat fuq il-piż totali inizjali tal-ħut f'kull reċipjent tal-prova. Jekk il-ħut jerggħu jintiżen fil-jum 14, ir-razzjon jerga' jiġi kkalkolat. L-ikel għandu jinżamm mill-ħut 24 siegħa qabel l-użin.

▼B

L-ikel li ma jittiekilx u l-materjal tal-ħmieġ ta' l-imsaren għandu jittneħħa kuljum mir-reċipjenti tal-prova permezz ta' tindif bl-attenzjoni tal-qiegh ta' kull tank bl-irdigh.

1.8.2.4. *Dawl u temperatura*

Il-fotoperjodu u t-temperatura ta' l-ilma għandhom ikunu xierqa għall-ispeċi tal-prova (l-Appendiċi 1).

1.8.3. **Konċentrazzjonijiet tal-prova**

Normalment ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma meħtieġa, ikun xi jkun d-disinn tal-prova (ara t-taqsim 1.7.2). Tagħrif minn qabel tat-tossiċità tas-sustanza tal-prova (eż. minn prova akuta u/jew minn studji biex tinstab il-firxa) għandhom ikunu ta' għajnunha biex jintgħaḥlu l-konċentrazzjonijiet tal-prova xierqa. Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk inqas minn ħames konċentrazzjonijiet huma użati. L-ogħla konċentrazzjoni ppruvata m'għandhiex teċċedi l-limitu tas-solubilità tas-sustanza fl-ilma.

Fejn jintuża aġent li jiffaċilita s-solubilità biex ighin fil-preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħzin, il-konċentrazzjoni finali tiegħu m'għanduz ikun aktar minn 0,1 ml/l u għandu preferibbilment ikun l-istess fir-reċipjenti kollha tal-prova (ara t-taqsim 1.6.3). Madankollu, għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' materjali bħal dawn.

1.8.4. **Kontrolli**

In-numru ta' kontrolli bl-ilma tat-tahlit jiddependi fuq id-disinn tal-prova (ara t-taqsimiet 1.7-1.7.2). Jekk jintuża aġent li jiffaċilita s-solubilità, allura l-istess numru ta' kontrolli bl-aġenti li jiffaċilitaw s-solubilità daqs kontrolli bl-ilma tat-tahlit għandhom jiġu inklużi wkoll.

1.8.5. **Frekwenza ta' determinazzjonijiet analitiċi u tiqjis**

Matul il-prova, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma determinati f'intervalli regolari (ara hawn taht).

Fil-provi flow-through, ir-rati ta' caqliq tas-soluzzjoni ta' ħzin dilwenti u tossikanti għandhom jiġu kkontrollati f'intervalli, preferibbilment kuljum, u m'għandhomx iwarjaw b'aktar minn 10 % matul il-prova. Fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova huma mistennija li jkunu bejn ± 20 % tal-valuri nominali (i.e. fil-firxa ta' 80-120 %; ara t-taqsimiet 1.6.2 u 1.6.3), huwa rakkomandat li, bħala minimu, il-konċentrazzjonijiet l-aktar għoljin u dawk l-aktar baxxi jiġu analizzati fil-bidu tal-prova u f'intervalli ta' kull ġimgħa wara dan. Għall-prova fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova mhix mistennija li tibqa' bejn ± 20 % tal-valuri nominali (fuq il-bażi ta' data dwar l-istabbiltà tas-sustanza tal-prova), huwa meħtieġ li jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha, imma bl-użu ta' l-istess reġim.

Fil-provi semi-statiċi (ta' tiġdid) fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova hija mistennija li tibqa' bejn ± 20 % tal-valuri nominali, huwa rakkomandat li, bħala minimu, il-konċentrazzjonijiet tal-prova l-aktar għoljin u dawk l-aktar baxxi jiġu analizzati meta ppreparati friski u immedjatament qabel it-tiġdid fil-bidu ta' l-istudju u ta' kull ġimgħa wara dan. Għall-provi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova mhix mistennija li tibqa' bejn ± 20 % tal-valuri nominali, il-konċentrazzjonijiet kollha tal-prova iridu jiġu analizzati bl-użu ta' l-istess reġim bħal dak użat għal sustanzi aktar stabbli.

▼B

Huwa rakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet meqjusa. Madankollu, jekk ikun hemm evidenza disponibbli biex turi li l-konċentrazzjoni ta' soluzzjoni tas-sustanza tal-prova inżammet b'mod sodisfaċenti bejn il- $\pm$ 20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-konċentrazzjoni inizjali meqjusa matul il-prova, allura r-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri nominali jew meqjusa.

Il-kampjuni jistgħu jehtieġu li jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' daqs tal-pori ta' 0,45 μ m) jew soġġetti għal azzjoni ċentrifuga. Iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tal-prova ma jiġix assorbit mill-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.

Matul il-prova, għandhom jitqiesu l-ossieġu mahlul, il-pH u t-temperatura fir-reċipjenti tal-prova kollha. L-ebusija totali, l-alkalinità u s-salinità (jekk relevanti) għandhom jitqiesu fil-kontrolli u freċipjent wiehed ta' l-oġġla konċentrazzjoni. Bħala minimu, l-ossieġu mahlul u s-salinità (jekk relevanti) għandhom jitqiesu tliet darbiet (fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem tal-prova). Fi provi semi-statiċi, huwa rakkomandat li l-ossieġu mahlul jitqies aktar spiss, preferibbilment qabel u wara kull tiġdid ta' l-ilma jew mill-inqas darba fil-ġimgha. Il-pH għandha titqies fil-bidu u fit-tmiem ta' kull tiġdid ta' l-ilma fi prova tat-tiġdid statiku u ta' l-inqas darba fil-ġimgha fi provi flow-through. L-ebusija u l-alkalinità għandhom jitqiesu darba f'kull prova. It-temperatura preferibbilment għandha tkun ikkontrollata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wiehed tal-prova.

1.8.6. Osservazzjonijiet

Piż: Fit-tmiem tal-prova l-hut kolha li jibqgħu hajjin għandhom jintiżnu bħala piż imxarrab (ixxugat) jew fi gruppi skond ir-reċipjent tal-prova jew individwalment. L-użin ta' l-annimali bir-reċipjent tal-prova huwa preferibbli mill-użin individwali li jehtieġ li l-hut ikun immarkat individwalment. Fil-każ ta' tiqjis tal-piżijiet individwali għad-determinazzjoni tar-rata ta' żvilupp speċifika għall-huta individwali, il-metodu ta' teknika ta' l-immarkjar magħżula għandha tevita li tohloq tensjoni fl-annimali (alternattivi għall-immarkjar bl-iffriżar jistgħu jkunu xierqa, eż. l-użu ta' xliet fin ikkulurit).

Il-hut għandu jkun eżaminat kuljum matul il-perjodu tal-prova u kull anormalità esterna (bħal emorraġija, telf tal-kulur) u mġieba anormali nnotata. Kull mewt għandu jiġi rreġistrat u l-hut mejjet jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-hut mejjet ma jiġix sostitwit, ir-rata tat-tagħbija u d-densità tal-ħzin huma biżżejjed biex jiġu evitati effetti fuq l-iżvilupp minhabba bdil fin-numru ta' hut f'kull tank. Madankollu, ir-rata ta' tmigh tkun tehtieġ li tiġi aġġustata.

2. DATA U RAPURTAĠĠ

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Huwa rakkomandat li espert ta' l-istatistika jkun involut kemm fid-disinn kif ukoll fl-analiżi tal-prova peress li dan il-metodu tal-prova jippermetti varjazzjoni konsiderevoli fid-disinn sperimentali bħal per eżempju, fin-numru ta' kompartamenti tal-prova, numru ta' konċentrazzjonijiet tal-prova, numru ta' hut, eċċ. Minhabba l-għażliet li huma disponibbli fid-disinn tal-prova, gwida speċifika dwar il-proċedura ta' l-istatistika ma tinghatax hawn.

▼B

Ir-rati ta' żvilupp m'għandhomx jiġu kkalkolati għar-reċipjenti tal-prova fejn il-mortalità teċċedi l-10 %. Madankollu, ir-rata tal-mortalità għandha tkun indikata għall-konċentrazzjonijiet tal-prova kollha.

Ikun liema metodu li jintuża biex tiġi analizzata d-data, il-kunċett ċentrali huwa r-rata ta' żvilupp speċifika r bejn il-ħin t_1 u l-ħin t_2 . Din tista' tiġi definita f'ħafna modi skond jekk il-ħut hux immarkat individwalment jew le jew skond jekk hix mehtieġa l-medja għat-tank.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

fejn:

r_1 = rata ta' żvilupp speċifika għall-ħuta individwali

r_2 = rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank

r_3 = rata ta' żvilupp "psewdo" speċifika

w_1, w_2 = rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank $\log_e$

w_1 = logaritmu tal-piż ta' ħuta individwali fil-bidu tal-perjodu ta' studju

$\log_e w_2$ = l logaritmu tal-piż ta' ħuta individwali fit-tmiem tal-perjodu ta' studju

$\log_e W_1$ = medja tal-logaritmi tal-valuri w_1 għall-ħut fit-tank fil-bidu tal-perjodu ta' studju

$\log_e W_2$ = medja tal-logaritmi tal-valuri w_2 għall-ħut fit-tank fit-tmiem tal-perjodu ta' studju

t_1, t_2 = ħin (jiem) fil-bidu u fit-tmiem tal-perjodu ta' studju

r_1, r_2, r_3 jistgħu jiġu kkalkolati għall-perjodu ta' minn 0-28 jum u, fejn xieraq (i.e. meta t-tiqis fil-jum 14 ikun sar) għall-perjodi ta' minn 0-14 u minn 14-28 jum.

2.1.1. **Analizi tar-riżultati bir-riġressjoni (mudellar tar-rispons għall-konċentrazzjoni)**

Dan il-metodu ta' analizi jaqbel ma' relazzjoni tal-matematika adattata bejn ir-rata ta' żvilupp speċifika u l-konċentrazzjoni, u għalhekk jaqbel possibbli l-istima ta' l- EC_{50} i.e. kull valur ta' l-EC mehtieġ. Bl-użu ta' dan il-metodu l-kalkolu ta' r għall-ħut individwali (r_1) mhux mehtieġ u minflok, l-analizi tista' tkun ibbażata fuq il-valur medju għat-tank ta' r (r_2). Dan il-metodu ta' l-aħħar huwa preferut. Huwa wkoll aktar xieraq fil-każ li jintuża l-iżgħar speċi.

Ir-rati ta' żvilupp medji speċifiċi għat-tank (r_2) għandhom jiġu mmarrkati fuq graff kontra l-konċentrazzjoni, sabiex tiġi spezzjonata r-relazzjoni tar-rispons mal-konċentrazzjoni.

▼B

Sabiex tiġi mfissra r-relazzjoni bejn r_2 u l-konċentrazzjoni, għandu jintgħażel mudell xieraq u l-għażla tiegħu għandha tkun sostnuta b'raġunar xieraq.

Jekk in-numri ta' hut li jibqgħu haġġin f'kull tank ma jkunux l-istess, allura l-proċess ta' tqabbil tal-mudell, kemm jekk sempliċi jew jekk mhux lineari, għandu jiġi peżat biex jippermetti għal gruppi ta' daqsijiet differenti.

Il-metodu ta' tqabbil tal-mudell għandu jagħmel possibbli l-istima ta', per eżempju, l-EC₂₀ u tad-dispersjoni tiegħu (jew l-iżball standard jew l-intervall ta' fiduċja). Il-graff tal-mudell imqabbel għandu jintwera fir-rigward tad-data sabiex s-suffiċjenza tat-tqabbil tal-mudell tista' tidher (8)(18)(19)(20).

2.1.2. **Analizi tar-riżultati għall-istima tal-LOEC**

Jekk il-prova tkun inkludiet ir-replikazzjoni tat-tankijiet fil-livelli kollha tal-konċentrazzjoni, l-istima tal-LOEC tista' tkun ibbażata fuq analizi tal-varjanza (ANOVA) tar-rata ta' żvilupp medja speċifika għat-tank (ara t-taqsima 2.1), segwita minn metodu adattat (eż. il-prova ta' Dunnett jew ta' Williams (12) (13) (14) (21)) għat-tqabbil tal-medja r għal kull konċentrazzjoni mal-medja r għall-kontrolli biex tiġi identifikata l-aktar konċentrazzjoni baxxa li għaliha din id-differenza hija sinifikattiva f'livell ta' probabbiltà ta' 0,05. Jekk is-supposizzjonijiet mehtieġa għall-metodi parametrici ma jintlahqux – distribuzzjoni mhux normali (eż. il-prova ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (il-prova ta' Bartlett), għandha tingħata konsiderazzjoni għat-trasformazzjoni tad-data biex jiġu omogenizzati l-varjanzi qabel ma ssir l-ANOVA, jew biex issir l-ANOVA mizuna.

Jekk il-prova ma tkunx inkludiet ir-replikazzjoni tat-tankijiet f'kull konċentrazzjoni, ANOVA bbażata fuq it-tankijiet ma tkunx sensittiva jew tkun impossibbli. F'din is-sitwazzjoni, kompromess aċċettabbli hu li l-ANOVA tkun ibbażata fuq ir-rata ta' żvilupp "pseudow" speċifika r_3 għall-hut individwali.

Il-medja ta' l- r_3 għal kull konċentrazzjoni tal-prova tista' imbagħad tiġi mqabbla mal-medja ta' l- r_3 għall-kontrolli. Il-LOEC tista' imbagħad tiġi identifikata b'hal qabel. Għandu jiġi konoxxut li dan il-metodu ma jipprovdi l-ebda konċessjoni għal, l-anqas protezzjoni kontra, il-varjabilità bejn it-tankijiet, aktar minn dik li hi ġġustifikata mill-varjabilità ta' bejn il-hut individwali. Madankollu, l-esperjenza uriet (8) li l-varjabilità bejn it-tankijiet kienet żgħira hafna meta mqabbla mal-arjabilità got-tank (i.e. bejn il-hut). Jekk il-hut individwali ma jkunx inkluz fl-analizi, il-metodu ta' identifikazzjoni ta' *data* anomala (outlier) u l-ġustifikazzjoni għall-użu tagħha għandhom ikunu provduti.

2.2. **INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

Ir-riżultati għandhom ikunu interpretati bl-attenzjoni fejn il-konċentrazzjonijiet meqjusa ta' tossikant fis-soluzzjonijiet tal-prova jsejnhu f'livelli qrib tal-limitu ta' osservazzjoni tal-metodu analitiku jew, fi provi semistatiċi, meta l-konċentrazzjoni tas-sustanza tal-prova tonqos minn soluzzjoni ppreparata friska għal qabel ma tiġġedded.

2.3. **RAPPORT TAL-PROVA**

Ir-rapport tal-prova għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

▼B**2.3.1. Sustanza tal-prova:**

- natura fizika u proprjetajiet fiżiċikimiċi rilevanti,
- *data* dwar l-identifikazzjoni kimika inkluż il-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza tal-prova fejn xieraq.

2.3.2. Speċi tal-prova:

- possibbilment, l-isem xjentifiku,
- razza, daqs, fornitur, kull trattament li jkun sar minn qabel, eċċ.

2.3.3. Kondizzjonijiet tal-prova:

- proċedura tal-prova użata (eż. semi-statiku/ta' tiġdid, flow-through, tagħbija, densità tal-ħzin, eċċ),
- disinn tal-prova (eż. numru ta' reċipjenti tal-prova, konċentrazzjonijiet u repliki tal-prova, numru ta' ħut f'kull reċipjent),
- metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħzin u frekwenza tat-tiġdid (l-aġent li jiffaċilita s-solubilità u l-konċentrazzjoni tiegħu għandhom jingħataw, meta użati),
- il-konċentrazzjonijiet nominali tal-prova, il-medji tal-valuri meqjusa u d-devjazzjonijiet mill-istandard tagħhom fir-reċipjenti tal-prova u l-metodu li bih dawn intlaħqu u evidenza li t-tiqjis jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tal-prova f'soluzzjoni vera,
- karatteristiċi ta' l-ilma għat-tahlit: pH, ebusija, alkalinità, temperatura, konċentrazzjoni ta' ossiġnu mahlul, livelli residwali ta' klorin (jekk meqjusa), karbonju organiku totali, solidi f'forma ta' suspensjoni, salinità tal-likwidu tal-prova (jekk meqjus) u kull tiqjis ieħor li jsir,
- kwalità ta' l-ilma fir-reċipjenti tal-prova: pH, ebusija, temperatura u konċentrazzjoni ta' ossiġnu mahlul,
- informazzjoni dettaljata dwar it-tmiġ (eż. tip ta' ikel, għajn, ammont mogħti u frekwenza).

2.3.4. Riżultati:

- evidenza li l-kontrolli laħqu l-kriterju ta' validità għas-sopravivenza, u data dwar l-imwiet li jseħhu f'kull waħda mill-konċentrazzjonijiet tal-prova,
- metodi ta' teknika ta l-istatistika analitika użati, statistika bbażata fuq ir-repliki jew il-ħut, trattament tad-data u ġustifikazzjoni tal-metodi ta' teknika użati,
- data mqassma f'forma tabulari dwar il-piż ta' ħut individwali u l-piż medju fil-jiem 0, 14 (jekk meqjusa) u 28, valuri tar-rati ta' żvilupp medji speċifiċi għat-tank jew pseudo speċifiċi (kif xieraq) għall-perjodi 0-28 jum jew possibbilment 0-14 u 14-28,
- riżultati ta' l-analiżi ta' l-istatistika (i.e. analiżi tar-rigressjoni jew ANOVA) preferibbilment f'forma tabulari u grafika u l-LOEC ($p = 0,05$) u n- NOEC jew l-EC_x ma', meta possibbli, l-iżbalji standard, kif xieraq,

▼B

— incidenza ta' kull reazzjoni mhux tas-soltu mill-hut u kull effett vizibbli ikkagunat mis-sustanza tal-prova.

3. REFERENZI

- (1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Ir-Rapport tal-WRc Nru PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M. J and Grandy N. J. (1990). EEC: Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Ir-Rapport Finali Lill-Kummissjoni tal-Komunitajiet Ewropej. Ir-Rapport tal-WRc Nru KEE: 2600-M.
- (3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, pg. 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, pg. 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Econ. Conta. Toxicol.* 28, pg. 287-297.
- (7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- (8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, ASTM STP 891, R. C. Bahner u D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pg. 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, jew atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Ir-Rapport EPS 1/RM/28, 81 pp. Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (10) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 ta' Diċembru 1991.
- (11) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pg. 1096-1121.
- (12) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pg. 482-491.
- (13) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, pg. 103-117.

▼B

- (14) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* 120, pg. 123-133.
- (15) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, pg. 33-41.
- (16) Post, G. (1987). *Nutrition and Nutritional Diseases of Fish*. II-Kapitolu IX fit-Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.
- (17) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, pg. 1485-1494.
- (18) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Ir-Rapport EA-6189 (American Petroleum Institute
- (19) Publication, Nru 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- (20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Ir-Rapport Tekniku Nru 05-88 tan-National Effluent Toxicity Assessment Center. Settembru 1988. 12-il pp.
- (21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pg. 510-531.

ANNEX 1

SPEĊI TA' HUT RAKKOMANDAT GHALL-PROVA U KONDIZZJONIJIET TAL-PROVA ADATTATI

Speċi	Firxa rakkoman- data tat-tempera- tura tal-prova (°C)	Fotoperjodu (sighat)	Firxa rakkoman- data għall-piż inizjali tal-hut (g)	Preċiżjoni mehtieġa fit-tiqiis	Rata tat-tagħbija (g/l)	Densità tal-ħżin (kull litru)	Ikel	Tul tal-prova (jiem)
Speċi rakkomandati								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> L-ispeċi fil- ġeneru ta' Salamun (rainbow trout)	12,5 - 16,0	12 – 16	1 – 5	Sa l-eqreb 100 mg	1,2 - 2,0	4	Ikel proprjetarju niexef magħmul minn hut żgħir tas- salmonid	≥ 28
Speċi ohra li huma ddokumentati tassew:								
<i>Danio rerio</i> zebrafish	21 – 25	12 – 16	0,050 - 0,100	Sa l-eqreb 1 mg	0,2 - 1,0	5 – 10	Ikel ħaj (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> ricefish (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 - 0,100	Sa l-eqreb 1 mg	0,2 - 1,0	5 – 20	Ikel ħaj (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28



ANNEX 2

**XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA GHAT-TAHLIT
AĊĊETTABBLI**

Sustanza	Konċentrazzjonijiet
Materja f'partikoli	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhix jonizzata	< 1 µg/l
Klorin residwali	< 10 µg/l
Pesticidi ta' l-organofosforu totali	< 50 ng/l
Pesticidi ta' l-organoklorin totali biż-żjeda ta' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l



ANNEX 3

Serje logaritmika ta' konċentrazzjonijiet tajbin għat-test ta' tossiċità (9)

Kolonna (numru ta' konċentrazzjonijiet bejn 100 u 10, jew bejn 10 u 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Serje ta' hames (jew iktar) konċentrazzjonijiet suċċessivi jistgħu jingħazlu minn kolonna. Il-*mid-points* ta' bejn il-konċentrazzjonijiet f'kolonna (x) jinsabu f'kolonna (2x + 1). Il-valuri msemija jistgħu jirrappreżentaw konċentrazzjonijiet li jingħadu bħala percentwal f'volum jew piż (mg/l jew µg/l). Il-valuri jistgħu jkunu multiplikati jew diviżi bi kwalunkwe *power of 10* kif inhu xieraq. Il-kolonna 1 tista' tintuża jekk ikkun hemm inċertezza konsiderevoli fil-livell ta' tossiċità.

▼B**C.15. PROVA TA' TOSSICITÀ B'TERMINU QASIR FUQ EMBRIJONI U STADJI TA' SAC-FRY TAL-HUT****1. METODU**

Dan il-metodu ta' ittestjar għal tossicità b'terminu qasir huwa replika tal-OECD TG 212 (1998).

1.1. DAHLA

Dan it-test ta' tossicità b'terminu qasir fuq embrijoni u stadji ta' sac-fry tal-hut huwa prova b'terminu qasir fejn jiġu esposti l-istadji tal-hajja minn meta bajda ġdida tiġi fertilizzata sa l-istadju ta' sac-fry. Ebda ikel ma huwa provdut fit-test ta' l-embrijon u sac-fry, u t-test għandu jiġi terminat waqt li s-sac-fry għadhom jiġu nutriti mill-membrana li tagħlaq go fiha l-isfar tal-bajda.

L-għan ta' dan it-test huwa sabiex jiddefinixxi effetti letali, u sa ċertu punt effetti sub-letali ta' kimiċi fuq l-istadji speċifiki u fuq l-ispeċi ittestjati. Dan it-test jipprovdi informazzjoni utli b'tali mod li jista' (a) jiffirma pont bejn testijiet letali u dawk sub-letali (b) jintuza bħala test ta' screening għal test komplut fuq l-istadji kollha tal-bidu tal-hajja jew għal test ta' tossicità kronika u (c) jista' jintuza biex jiġu ittestjati speċi li it-tkabbir tagħhom m'huwiex avvanzat biex ikopri biżżejjed il-perjodu ta' transizzjoni minn nutriment endoġenu għal dak esoġenu.

Ta' min jiftakar li testijiet li jinkorporaw il-fażijiet kollha tal-hajja tal-huta huma ġeneralment suġġetti li jagħtu stima eżatta tat-tossicità kronika tal-kimiċi għall-hut, u kwalunkwe tnaqqis fl-espożizzjoni fir-rigward ta' stadji tal-hajja jistgħu inaqqsu is-sensittività ta' dan it-test u għalhekk jissottovalutaw it-tossicità kronika. Għalhekk hu mistenni li t-test ta' l-embrijon u ta' l-istadji ta' sac-fry ikun inqas sensittiv minn dak ta' test komplut fuq l-istadji kollha tal-bidu tal-hajja, partikolarment fejn jidhlu kimiċi li għandhom lipofilità għolja ($\log P_{ow} > 4$) u kimiċi b'mod ta' azzjoni tossika speċifika. Madankollu differenzi zgħar bejn iż-żewġ testijiet huma mistennija għal kimiċi li m'għandhomx mod ta' azzjoni narkotika speċifika (1).

Qabel ma' ġie ppublikat, dan it-test ta' l-embrijon u ta' sac-fry ġie ppruvat l-aktar fuq hut ta' l-ilma helu *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – magħruf aktar bħala zebrafish). Għaldaqstant l-appendiċi 1 jagħti gwida aktar dettaljata ta' l-eżekuzzjoni ta' dan it-test fuq din l-ispeċi. Dan ma jeskludix l-użu ta' speċi oħra għal liema diġà hemm xi prova disponibbli (Tabella 1).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Konċentrazzjoni minima b'effett sinifikanti (LOEC): hija l-aktar konċentrazzjoni baxxa ttestjata mis-sustanza tat-test fejn is-sustanza ikollha effett sinifikattiv ($f_p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, kull konċentrazzjoni 'l fuq mill-LOEC għandu jkollha effett ta' ħsara daqs jew aktar minn dawk osservati fl-LOEC.

Konċentrazzjoni massima minghajr effetti sinifikanti (NOEC): hija l-prova ta' konċentrazzjoni eżatt taht l-LOEC.

▼B**1.3. PRINĊIPJU TAT-TEST**

L-istadji ta' l-embrijon u tas-sac-fry tal-hut huma esposti għal sensiela ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza għall-prova dissolta fl-ilma. Il-protokoll jippermetti għażla bejn proċedura semi-statika jew proċedura b'ċirkolazzjoni kontinwa. Din l-għażla tiddependi fuq in-natura tas-sustanza li ser tiġi ittestjata. Dan it-test jibda billi jitpoġġew bajd fertilizzat fil-kontenituri u jintemm eżatt qabel ma l-membrana li taghlaq go fiha l-isfar tal-bajd ta' xi wahda mil-larva f'xi kontenitur tkun assorbita kompletament jew qabel ma l-kontrolli jibdwu imutu tal-ġuħ. Effetti letali u sub-letali huma evalwati u mqabbla mal-valuri relattivi għall-kontrolli bl-iskop li tiġi determinata l-konċentrazzjoni minima b'effetti sinifikanti. L-alternattiva hi li jiġu analizzati billi jintuza mudell rigressiv sabiex tkun stmata il-konċentrazzjoni li tista' tikkawża effett perċentwali (i.e. LC/ECx, fejn x hija effett % definit).

1.4. INFORMAZZJONI FUQ IS-SUSTANZA TAT-TEST

Ir-riżultati ta' test ta' tossiċità qawwija (ara metodu C.1) preferibbilment ma' l-ispeċi magħżula għal dan it-test, għandhom ikunu disponibbli. Ir-riżultati jistgħu jkunu utli biex tintgħażel sensiela ta' konċentrazzjonijiet tat-test mill-istadji tal-bidu tal-hajja. Is-solubilità ta' l-ilma (inkluż is-solubilità fl-ilma tat-test) u l-prensa tal-fwar għandhom ikunu magħrufa. Għandu jkun hemm metodu ta' min jorbot fuqu disponibbli, għal kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, b'eżattezza magħrufa u rappurtata kif ukoll il-limitu ta' rivelazzjoni.

L-informazzjoni utli fuq is-sustanza tat-test sabiex jiġu definiti il-kondizzjonijiet għall-eżekuzzjoni tat-test tinkludi il-formola strutturali, il-purità tas-sustanza, dawl stabbli, stabbiltà fil-kondizzjonijiet ta' l-eżekuzzjoni tat-test, pKa, Pow u r-riżultati ta' test ta' bijodegradibiltà immedjata (ara metodu C.4).

1.5. VALIDITÀ TAT-TEST

Biex test ikun validu dawn il-kondizzjonijiet li ġejjin għandhom japplikaw:

- is-sopravivenza komplessiva tal-bajd fertilizzat fil-kontrolli, u fejn hu relevanti, fil-kontenituri ta' solvent biss, għandha tkun aktar jew daqs il-limiti definiti fl-Annessi 2 u 3,
- matul it-test, il-konċentrazzjoni ta' l-ossigenu dissolt għandha tkun bejn 60 u 100 % tal-valur ta' l-arja saturata (ASV),
- it-temperatura ta' l-ilma m'għandhiex tvarja b'iktar minn $\pm 1,5$ °C bejn il-kompartamenti divesri jew bejn ġranet suċċessivi waqt il-hin tat-test u għandha tkun fil-limitu tas-sensiliet speċifikati ta' temperaturi għall-ispeċi użati fit-test (Annessi 2 u 3).

▼B

1.6. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.6.1. **Il-Kompartamenti tat-test**

Jista' jintuża kull tip ta' reċipjent tal-ħġieg jew kimikament inerti. Id-dimensjonijiet tar-reċipjenti għandhom ikunu kbar biżżejjed sabiex ikunu konformi mar-rata ta' tagħbija (ara taqsima 1.7.1.2). Hu rakkomandat li l-kompartamenti tat-test ikunu pożizzjonati kif ġie ġie fil-post fejn ser isir it-test. Jekk fil-laboratorju jeżistu effetti sistematiċi kontrollabbli permezz ta' separazzjoni bi blokki, preferibbilment għandu jintuża disinn sperimentali bi blokki ta' daqs irregolari fejn kull trattament ikun preżenti f'kull blokk, monflok ma jintuża disinn kompletament irregolari. Jekk jintuża il-metodu ta' għeluq, dan għandu jittiehed in konsiderazzjoni fl-analiżi sussegwenti ta' data. Il-kompartamenti tat-test għandhom ikunu imharsa minn kwalunkwe interferenza.

1.6.2. **Selezzjoni ta' speċi ta' hut**

Speċi ta' hut rakkomandat huma mnizzla f'tabella 1A. Din ma tippermettix l-użu ta' speċi oħrajn (eżempji huma mogħtija f'tabella 1B), iżda il-proċedura tat-test tista tkun adattata sabiex tipprovdi kondizzjonijiet adattati għat-test. F'dan il-każ, ir-raġuni li tiġġustifika l-għażla ta' l-ispeċi u l-metodu sperimentali għandhom ikunu magħrufa.

1.6.3. **Trobbija tal-hut riptoduttiv**

Dettalji fuq iż-żamma tal-hut riproduttiv f'kondizzjonijiet sodisfaċenti jinstabu f'OECD TG 210 ⁽¹⁾ u preferenzi (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4. **Immaniġġjar ta' embrijoni u larva**

Embrijoni u larva jistgħu ikunu esposti, fil-kontenitur ewlieni, f'kontenituri iżgħar bil-ġnub jew bit-truf miksija b'xibka sabiex jippermettu ċ-ċirkolazzjoni tas-sustanza tat-test madwar il-kontenitur. Wiehed jista jasal għal ċirkolazzjoni non turbolenti f'dawn il-kontenituri iżgħar billi jdendilhom ma' brazz b'tali mod li jkunu jistgħu jiċċaqalqu 'l fuq u 'l isfel iżda xorta wahda l-organi jibqgħu mgħarrqa; tista' tiġi uzata wkoll sistema bis-sufun. Bajd iffertilizzat ta' hut salmonidu jista' jiġi sistemati fuq xkafef jew xbieki b'fethiet kbar biżżejjed li jippermettu il-bajd jgħaddu wara it-tfaqqis. Il-pipetti tat-tip pasteur huma l-aktar adattati għat-tneħħija ta' l-embrijoni u tal-larva fit-testijiet semistatiċi b'tiġdid kuljum ta' l-ilma (ara paragrafu 1.6.6).

Il-kontenituri, il-gradilji jew ix-xbieki li ntużaw biex iżommu l-bajd ġol-kontenitur ewlieni tat-test, għandhom jitneħħew wara li jfaqqsu l-larva ⁽¹⁾, bl-eċċezzjoni li x-xbieki għandhom jithallew sabiex iwaqqfu l-hut milli jaharbu. Jekk ikun hemm il-bżonn li jiġu mċaqalqa il-larva, dawn m'għandhomx ikunu esposti għall-arja u m'għandhomx jintużaw xbiek biex jiġu mħarrba hut mill-kontenituri tal-bajd (prekawzjoni bħal din tista ma tkunx neċessarja għal speċ inqas delikat bħal per eżempju il-carp). Il-hin tat-trasferiment ivarja skond l-ispeċi u mhux dejjem ikun hemm bżonn ta' dan it-trasferiment. Għat-teknika semistatika jistgħu jintużaw buqari jew kontenituri baxxi, u jekk ikun hemm bżonn dawn ikunu armati b'xibka bħala paraventu kemm kemm 'il fuq mill-qigh tal-buqar. Jekk il-volum ta' dawn il-kontenituri huwa biżżejjed sabiex jaqbel mal-bżonn tat-tagħbija, (ara 1.7.1.2) ma jkunx hemm bżonn ta' trasferiment ta' embrijoni u larva.

⁽¹⁾ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

▼B

1.6.5. **Ilma**

Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit kif imnizżel f'Appendiċi 4 u ġo liema ilma l-ispeċi użata fit-test turi kapacià ta' sopravivenza almenu daqs dik deskritta f'Appendiċi 2 u 3, huwa ilma tajjeb biex ikun użat fittest. L-ilma għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-tets. Il-pH għandha tjinzamm fil-limitu ta' $\pm 0,5$ unità pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma dilwit ma jhallix effetti mhux mixtieqa fuq ir-riżultat tat-test (per eżempju taħwid tas-sustanza), jew kuntrarjament jaffettwa il-hut riproduttiv, għandhom jittiehdu kampjuni biex jiġu analizzati regolarment. Qisien ta' metalli tqal (per eżempju. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd u Ni), anjoni u katjoni maġġuri (eż. Ca, Mg, Na, K, Cl u SO_4), pestiċidji (per eżempju pestiċidji b'organofosforu totali u organoklorin totali), karbon totalment organiku u solidi sopiżi għandhom ikunu magħmula kull tliet xhur, meta ilma tat-tahlit ikollu kwalità relattivament kostanti. Jekk il-kwalità ta' l-ilma tkun kostanti almenu għal sena, qatgħat decizivi jistgħu jkun anqas frekwenti u l-intervalli jistgħu jkun anqas frekwenti (per eżempju kull sitt xhur).

1.6.6. **Soluzzjonijiet tat-test**

Soluzzjonijiet tat-test fuq il-koncentrazzjonijiet magħżula, huma preparati b'tahlit ta' soluzzjoni ewlenija.

Din is-soluzzjoni għall-ħażna għandha tkun preparata preferibilmement billi is-sustanza tat-test tithallat u tithawwad ma' l-ilma b'mezzi mekkaniċi (per eżempju tqanqil u ultrasonikazzjoni). Sabiex tiġi milhuqa soluzzjoni konċentrata ewlenija, jistgħu jintużaw kolonni saturati (kolonni solubili). Sa fejn hu possibbli għandu jiġi evitat l-użu ta' solvents jew dispersants (aġenti solubilizzanti); madankollu, ċertu komposizzjonijiet jistgħu jiġu bżonnjużi f'ċerti każi sabiex tiġi prodotta soluzzjoni konċentrata xierqa. Eżempji ta' solvents adattati huma aċetun, ethanol, metanol, dimethylformamide u triethylene-glycol. Eżempji ta' dispersants adattati huma Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % and HCO-40. Meta jintużaw aġenti li jkollhom bijo-degradibbiltà mghaġġla (per eżempju: aċetun) jew li jevaporaw malajr, wiehed irid juża kawtela peress li dawn jistgħu jikkawżaw problemi fil-kreazzjoni ta' batterja f'testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa. Meta jkun użat aġent solubbli, dan m'għandux iħalli l-ebda effett sinifikanti fuq is-sopravivenza u l-anqas xi effett negattiv fuq l-istadji inizjali ta' ħajja kif juri il-kontroll li jkun solvent biss. Madankollu, għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' materjal bħal dan.

Għat-teknika semi-statika jistgħu jintużaw żewġ proċeduri ta' tiġdid differenti; jew (i) li jiġu preparati soluzzjonijiet godda f'kontenituri nodfa u il-bajd ħaj u il-larva jiġu trasferiti delikatement fil-kontenituri godda li jkollhom fihom volum żgħir mis-soluzzjoni il-qadima, kif ukoll jiġi evitat li jiġu esposti għall-arja, jew (ii) l-oġaniżmi tat-test jinżammu fil-kontenituri filwaqt li proporzjon (almenu tliet kwarti) mill-ilma tat-test jinbidel. Il-frekwenza ta' tiġdid ta' dan il-mezz ikun jiddependi fuq l-istabilità tas-sustanza ittestjata, iżda tiġdid kuljum ta' l-ilma huwa rakkomandat. Jekk minn testijiet preliminari ta' stabilità (ara sezzjoni 1.4) jirriżulta li l-koncentrazzjoni tas-sustanza ittestjata m'hijiex stabbli (jiġifieri barra mill-parametri 80-120 %, tal-koncentrazzjoni nominali jew inqas minn 80 % ta' tal-koncentrazzjoni imkejla inizjalment) waqt il-perjodu ta' tiġdid, jehtieg li jittiehed in-konsiderazzjoni l-użu ta' test b'ċirkolazzjoni kontinwa. Fi kwalunkwé każ jehtieg li jiġi evitat kull li jiġu stressjati il-larvae waqt li l-ilma jkun qed jiġġedded.

▼B

Testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa jirrikjedu sistema li kontinwament tiddispensa u thallat is-soluzzjoni inizjali (per eżempju metering pump, proportional diluter, saturator system) biex ikunu jistgħu jipprovdi serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartamenti tat-test. T Ir-rati ta' ċirkolazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u ta' l-ilma għat-taħlit m'għandhomx ivarjaw b'iktar minn 10 % matul it-test. Rata ta' ċirkolazzjoni ekwivalenti almenu għall-volum ta' hames kompartamenti tat-test għal 24 siegħa hija adattata (2).

1.7. PROCEDURA

Fil-letteratura wiehed isib informazzjoni utli fuq il-prestazzjoni ta' testijiet fuq l-embrijuni tal-hut kif ukoll fuq it-testijiet ta' tossiċità ta' sac-fry, b'xi eżempji jinstabu wkoll fil-biblijografija inkluża ma' dan it-test (7) (8) (9).

1.7.1. Kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni

1.7.1.1. *Tul ta' Żmien*

Dan it-test għandu jibda preferibilmint fi żmien 30 minuta wara li jkunu ġew iffertilizzati l-bajd. L-embrijoni għandhom jiġu mgharrqa fis-soluzzjoni tal-prova qabel jew eżatt wara li jkun beda l-istadju tal-qsim tal-blastodisc, imma dejjem qabel ma jkun beda l-istadju tal-gastrula. It-test ma jistax jinbeda immedjatament wara l-fertilizzazzjoni jekk il-bajd ikun ġej minghand sorsi kummerċjali. Billi kull dewmien jista' jinfluwenza serjament is-sensittività tat-test, it-test għandu jibda fi żmien tmien sigħat wara il-fertilizzazzjoni. Billi il-larva ma jingħatawx ikel waqt il-perjodu ta' espożizzjoni, it-test għandu jintemm eżatt qabel ma tkun inxtorbot il-membrana li tagħlaq ġo fiha l-isfar tal-bajd fi kwalunkwe mill-kompartamenti li qed isiru t-testijiet fihom jew qabel ma jkunu jew imutu minhabba nuqqas ta' ikel. Id-dewmien jiddependi fuq l-ispeċi li qed tkun użata. F'l-Appendiċi 2 u 3 wiehed isib xi rakkomandazzjonijiet f'dan ir-rigward.

1.7.1.2. *Tagħbija*

In-numru ta' bajd fertilizzat għandu jkun biżżejjed sabiex jissodisfaw it-talbiet ta' l-istatistika. Dawn għandhom ikunu distribwiti kif ġie ġie fost it-trattamenti, u għal kull konċentrazzjoni għandhom jintużaw almenu 30 bajda fertilizzata imqassmin indaqs, (jew almenu ndaqs kemm jista' jkun billi jista' jkun diffiċli li jkollok gruppi ndaqs meta tkun qed tuża ċertu speċi) bejn almenu tliet kompartamenti replika. Ir-rata ta' tagħbija (bijomassa skond il-volum tas-soluzzjoni ittestjata) għandha tkun baxxa biżżejjed b'tali mod li tippermetti li tinzamm konċentrazzjoni ta' ossiġnu dissolt ta' almenu 60 % ASV minghajr arjazzjoni. Huwa rakkomandat li għal testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa, ir-rata ta' tagħbija ma taqbiżx 0,5 g/l għal 24 siegħa u ma taqbiżx 5 g/l ta' soluzzjoni fi kwalunkwé hin (2).

1.7.1.3. *Dawl u temperatura*

It-temperatura tal-fotoperjodu u ta' l-ilma għandha tkun wahda xierqa għall-ispeċi li qed ikunu ttestjati (Appendiċi 2 u 3). Biex tkun ikkontrollata it-temperatura ikun opportun li jintuża reċipjent tat-test mizjud.

▼B**1.7.2. Konċentrazzjonijiet tat-test**

Normalment huma rikjesti hames konċentrazzjonijiet tat-test li għandhom fattur ta' differenza kostanti u li ma jaqbiżx it-3,2. Fl-għażla tas-sensjela ta' konċentrazzjonijiet tat-test wieħed għandu jiehdu in-konsiderazzjoni il-kurva li tirrelata l-LC50 mal-perjodu ta' espożizzjoni fl-istudju ta' tossiċità qawwija. F'xi ċirkostanzi, bħal per eżempju f'testijiet tal-limitu, ikun aktar adattat li jintużaw inqas minn hames konċentrazzjonijiet kif ukoll l-intervall ta' konċentrazzjonijiet ikun aktar ristrett. Trid tingħata spjegazzjoni jekk jintużaw anqas minn hames konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet b'sustanza għola minn LC₅₀ f'69 siegħa jew 100mg/l, bl-ebda differenza għal liema hija l-aktar baxxa, m'għandhomx għalfejn jiġu ttestjati. Is-sustanzi m'għandhomx ikunu ittestjati fl-ilma tat-test 'il fuq mil-limitu ta' solubilità tagħhom.

Meta aġent solubilizzanti ikun użat biex jgħin fil-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet għat-test (ara sezzjoni 1.6.6), il-konċentrazzjoni finali fir-reċipjenti tat-test m'għandhomx ikunu aktar minn 0,1 ml/l u għandu jkun l-istess fir-reċipjenti kollha.

1.7.3. Kontrolli

Apart il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ittestjata, irid jiġi ippreparat ukoll kontroll bl-ilma għat-tahlit (ripetuta skond il-bżonn) u eventwalment kontroll ukoll bl-ilma li fih l-aġent solubilizzanti (ripetut skond il-bżonn).

1.7.4. Frekwenza tad-determinazzjonijiet u qisien analitiċi

Waqt it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza huma determinati f'intervalli regolari.

Huwa rakkomandat li f'testijiet semi-statiċi, il-konċentrazzjoni tat-test, li mistennija tibqa' fl-iskala ta' $\pm 20\%$ tal-valur nominali, (i.e. bejn 80-120 %; ara sezzjoni 1.4 u 1.6.6), l-għola u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test, ikunu analizzati meta jkunu għadhom kif ġew preparati u immedjatement qabel it-tibdil ta' l-ilma almenu tliet darbiet imqassmin tul il-perjodu tat-test (i.e. l-analiżi għandhom jiġu effettwati fuq kampjun ta' l-istess soluzzjoni li tkun għadha kemm giet ippreparata u wara fil-mument li ser tkun ha tinbidel).

Huwa neċessarju li fil-każi ta' testijiet fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza li qed tiġi ittestjata m'hix mistennija li tibqa' fil-limitu ta' $\pm 20\%$ tal-valur nominali (fuq il-bażi ta' data fuq l-iatbilità tas-sustanza) jiġu analizzati il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test, eżatt meta jkunu għadhom kif ġew preparati u kif ikunu qed jinbidlu, iżda tinzamm l-istess skema (i.e. fi tliet okkażjonijiet imqassma mat-test kollu). Id-determinazzjoni tas-sustanza ittestjata qabel it-tiġdid tas-soluzzjoni, għandha ssir fuq replika tar-reċipjent għal kull konċentrazzjoni tat-test. L-intervalli ta' bejn id-determinazzjonijiet ma jridux ikunu aktar minn sebat ijiem. Huwa rakkomandat li ir-riżultati ikunu ibbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk ikun hemm evidenza li turi li l-konċentrazzjoni tas-sustanza ittestjata fis-soluzzjoni hi fil-limitu ta' $\pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni nominali jew tal-konċentrazzjoni mkejla inizjalment matul it-test, allura ir-riżultati jistgħu ikunu bażati fuq valuri nominali jew fuq valuri imkejla inizjalment.

Għal testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa, l-użu ta' reġim ta' kampjuni simili għal dak deskritt għal testijiet semistatiċi hu adattat (iżda f'dan il-każ, il-qisien ta' soluzzjonijiet antiki ma japplikawx). Madankollu, jekk it-test idur aktar minn sebat ijiem, huwa rakkomandat li jiżiedu l-okkażjonijiet meta jittiehdu kampjuni (eż. tliet settijiet ta' qisien) biex tkun żgurata l-istabilità tal-konċentrazzjonijiet ittestjati.

▼B

Jista' jaghti l-każ li il-kampjuni jkollhom bżonn li jiġu separati jew iffiltrati (Eż. billi jintużaw pori ta' daqs 0,45 µm). Madankollu, billi la s-separazzjoni u l-anqas il-filtrazzjoni ma jidher li dejjem jisseparaw il-frazzjoni non bijodisponibbli tat-test minn dik bijodisponibbli, il-kampjuni jistgħu ma jiġux sugġetti għal dawk it-trattamenti.

Waqt it-test, l-ossigenu dissolt, il-pH u it-temperatura, għandhom jiġu mkejla f'kull reċipjent tat-test. L-ebusija kif ukoll is-salinità (jekk relevanti) totali, għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'recipjent wiehed li jkollu l-ogħla konċentrazzjoni. L-ossigenu u is-salinità (jekk relevanti), għandhom jitkejlu minimament tliet darbiet (fil-bidu, fin-nofs u fl-aħħar tat-test). Huwa rakkomandat, li f'testijiet semi-statici, l-ossigenu dissolt jiġi mkejjel aktar spiss, preferibbilment qabel u wara kull tiġdid ta' l-ilma, jew almenu darba fil-ġimgħa. Il-pH, f'testijiet semi-statici, għandha tiġi mkejla fil-bidu u fl-aħħar ta' kull tiġdid ta' l-ilma u ta' l-inqas darba fil-ġimgħa fil-każ ta' testijiet b'ċirkolazzjoni kontinwa. L-ebusija għandha tkun imkejla darba f'kull test. It-temperatura għandha titkejjel kuljum u preferibbilment għandha tkun osservata kontinwament almenu f'kompartament wiehed tat-test.

1.7.5. Osservazzjonijiet

1.7.5.1. Stadju ta' żvilupp embrijoniku

L-istadju embrijoniku (i.e. embriju fl-ewwel stadju ta' żvilupp) fil-bidu ta' l-espożizzjoni tas-sustanza ittestjata, għandu jkun verifikat kemm jista' jkun bi preċiżjoni. Dan jista' jsir billi jintuża kampjun rappreżentattiv tal-bajd li jkun prezervat u separat kif jixraq. Għal deskrizzjoni u xbiehat ta' l-istadji embrijoniċi wiehed jista' jirreferi għall-letteratura (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. Tfaqqis u sopravvivenza.

Ta' l-inqas darba kuljum, għandhom isiru osservazzjonijiet, kif ukoll jiġu dokumentati ċ-ċifri tat-tfaqqis u tas-sopravivenza. Jista' jaghti l-każ li jkunu jridu jsiru osservazzjonijiet aktar frekwenti fil-bidu tat-test (eż. kull 30 minuta matul l-ewwel tliet sigħat) billi f'ċerti każi dawn jista' jkollom aktar relevanza milli n-numru ta' mwiet biss (eż. meta hemm effetti tossiċi qawwijin). Embrijoni u larva mejta għandhom jitnehhew hekk kif jiġu innutati billi dawn jithassru malajr. Wiehed għandu joqghod ferm attent meta jkunu qed jitnehhew individwi mejta li ma jitlaqqgħux jew issir xi ħsara lill-bajd/larva ta' hdejjhom billi dawn huma delikati ħafna. Ir-raġunijiet tal-mewt ivarjaw skond f'liema stadju ta' hajja jkunu:

— għal bajd: partikolarment fl-istadji tal-bidu, nuqqas notevoli ta' traslucidità u bidla fil-kulur, kawża ta' koagulazzjoni li twassal għal dehra bajda mčajpra,

— għal embrijoni: nuqqas ta' ċaqliq tal-ġisem u/jew nuqqas ta' taħbit tal-qalb u/jew tidnis imčajpar tal-kulur fi speċi li l-embrijoni tagħhom huma normalment trasparenti,

— għal larva: immobilità u/jew nuqqas ta' movement respiratorju u/jew nuqqas ta' taħbit tal-qalb u/jew is-sistema ta' nervituri ċentrali ssir ta' kulur abjad imčajpar u/jew nuqqas ta' reazzjoni fl-istimolu mekkaniku.

▼B1.7.5.3. *Aspett anormali*

In-numru ta' larva li juru anormalitajiet fil-forom tal-gisem u/jew pigmentazzjoni, u l-istadju ta' assorbiment tal-membrana li taghlaq go fiha l-isfar ta' bajda, għandhom ikunu dokumentati f'intervalli adegwati skond it-tul tat-test kif ukoll in-natura ta' l-anormalità deskritta. Ta' min jinnota li embrijoni u larva anormali huma fenomeni naturali u fil-kontroll(i) ta' xi speċi jsitghu jlahhqu hafna punti percentwali. Annimali anormali għandhom jitnehhew mir-reċipjenti tat-test, meta jmutu biss.

1.7.5.4. *Imgieba anormali*

Anormalitajiet, bhal per eżempju tehid tan-nifs mghaġġel hafna, ghawm mhux koordinat, u inattività atipiku għandhom jiġu dokumentati f'intervalli adegwati skond it-tul tat-test. Dwan l-effetti, għalkemm diffiċli biex jiġu kwanitifikati, meta jkun osservati, jistghu jghinu fl-interpretazzjoni ta' l-informazzjoni fuq l-imwiet, jiġifieri, jipprovdu informazzjoni fuq il-mod ta' azzjoni tossika tas-sustanza.

1.7.5.5. *Tul*

Fi tmiem it-test, huwa rakkomandat li jitkejlu it-tulijiet ta' kull individwu u jistghu jintużaw qisien standard, mifrudin jew tat-tul totali. Madankollu, jekk il-ġewnaħ tad-denb tithassar jew tithaffer, għandhom jintużaw qisien standard. Generalment, f'testijiet immexxija tajjeb, il-koeffiċjent tal-varjazzjoni fit-tul fost ir-repliki fil-kontrolli għandu jkun $\leq 20\%$.

1.7.5.6. *Piż*

Fl-aħħar tat-test, jistghu jitkejlu il-piżijiet individwali; il-piżijiet xotti (24 siegħa f60 °C) huma preferuti minn dawk umduzi (wara li jkun għew ixxuttati). Generalment, f'testijiet immexxija tajjeb, il-ko-effiċjent tal-varjazzjoni fil-piż fost ir-repliki fil-kontrolli għandu jkun $\leq 20\%$.

Dawn l-osservazzjonijiet iwasslu sabiex l-informazzjoni mogħtija hawn tkun għad-dispożizzjoni ta' statistika analitika:

— mwiet kumulattiv,

— numru ta' larva b'saħħita fl-aħħar tat-test,

— hin biex jibda u jispiċċa it-tfaqqis (i.e. 90 % ta' tfaqqis fir-repliki),

— numru ta' larva li jfaqqsu kuljum,

— tul (u qies) ta' annimali li baqghu hajjin fi tmiem it-test,

— numru ta' larva li huma deformati jew b'apparenza anormali,

— numru ta' larva li qed juru imġieba anormali.

▼B

2. DATA U RAPPORTAĠĠ

2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI

Huwa rakkomandat li l-istatistiku jkun involut kemm fid-disinn kif ukoll fl-analizi tat-test billi il-metodu jhalli lok għal varjazzjoni konsiderevoli fl-esperiment fid-disinn, per eżempju fin-numru ta' kompartamenti tat-test, fin-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' bajd fertilizzat li ser jibda bih u fil-parametri mkejla. Fid-dawl ta' dawn l-alternativi fid-disinn tat-test, gwisda speċifika fuq il-proċeduri statistiċi i m'humiex mogħtija hawn.

Jekk ser jiġu kalkolati l-LOEC/NOEC allura jkun hemm bżonn li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki billi tintuza l-analizi tal-varjazzjoni (ANOVA) jew proċeduri ta' tabelli kontingenti. Il-metodu ta' Dunnett jista' jkun utli (12) (13) sabiex isir tqabbil bejn ir-riżultati f'konċentrazzjonijiet individwali u r-riżultati fil-kontrolli. Huma wkoll disponibbli eżempji oħra utli (14) (15). Id-daqs ta' l-effett li jiġi identifikat meta jintuza l-metodu u proċeduri oħra, (i.e. il-qawwa tat-test) għandu jkun kalkolat u dokumentat. Għandu jkun innutat li mhux kull osservazzjoni mnizzla f'taqsima 1.7.5.6 hija adattata għal analizi ta' statistika bil-metodu ANOVA. Per eżempju, mwiet kumulattiv u n-numru ta' larva b'saħħitha fit-tmiem tat-test, jistgħu jiġu analizzati b'metodi ta' probit.

Jekk se jkunu kalkolati LC/EC_xs, iridu jkunu mdahhla fid-*data* kurva(i) adattata(i) bhall-kurva loġistika, billi jintuza metodu statistiku bħal kaxxi minimi jew kaxxi minimi li mhux linejari. Il-kurva(i) għandha(hom) tkun(u) mqiegħda f'parametri sabiex l-LC/EC_x interessata u l-izball standard tagħha jista' jkun kalkolat direttament. Dan iħaffef hafn aktar il-kalkoli tal-limiti ta' kunfidenza madwar l-LC/EC_x. Sakemm ma jkunx hemm motivi sabiex jiġu preferiti livelli affidabbli differenti, għandha tiġi kwotata 95 % ta' kunfidenza b'żewġ livelli. Preferibilmiet, il-proċedura ta' adattament għandha tipprovdi mezz biex jiġi valutat is-sinifikat tan-nuqqas ta' addattament. Jistgħu jintużaw metodi grafiċi għal kurvi xierqa. Analizi rigressiva hi adattata għall-osservazzjonijiet kollha mnizzla f'taqsima 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Ir-riżultati għandhom ikunu trattati b'kawtela fil-kazijiet ta' meta fis-soluzzjonijiet tat-test jitkejlu konċentrazzjonijiet ta' sustanzi tossiċi fil-limitu ta' osservazzjoni tal-metodu analitiku. L-interpretazzjoni tar-riżultati ta' koċentrazzjonijiet 'il fuq mil-livell ta' solubilità tas-sustanza, għandha ssir b'kawtela wkoll.

2.3. RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi din l-informazzjoni:

2.3.1. Sustanza tat-test:

— in-natura fiżika u l-karatteristiċi fiżiċi relevanti tal-kimika,

— fejn relevanti, l-identifikazzjoni kimika tad-*data*, inklużi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza ttestjata.

▼B**2.3.2. Speċi ittestjati:**

- l-isem xjentifiku, il-purità, in-numru ta' hut riproduttiv (jiġifieri kemm intużaw speċi femminili biex ġew prodotti in-numru ta' bajd fertilizzat li ġie użat fit-test), minn fejn originaw u l-metodu ta' kollezzjoni tal-bajd fertilizzat u manipulazzjoni suċċessiva.

2.3.3. Kondizzjonijiet tat-test:

- proċedura użata fit-test (eż. semistatika jew b'ċirkolazzjoni kontinwa, perjodu ta' hin mill-fertilizzazzjoni sal-bidu tat-test, manipulazzjoni, eċċ),
- fotoperjodu(i),
- disinn tat-test (eż. numru ta' kompartamenti tat-test u repliki tagħhom, numru ta' embrijoni replikati),
- metodu ta' preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ta' hażna u l-frekwenza ta' tiġdid (l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjonijiet tiegħu għandhom jingħataw meta jiġu użati),
- il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-valuri mkejla kif ukoll il-medja u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu ta' kif dawn jintlaħqu u jekk is-sustanza ttestjata tinhallx fl-ilma b'konċentrazzjonijiet inqas minn daww ittestjati, għandhom jiġu provduti sabiex il-qisien jirreferu għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza ttestjata fis-soluzzjoni,
- karatteristiċi ta' l-ilma mhallat: p pH, solidità, temperatura, konċentrazzjoni ta' ossiġnu dissolt, livelli ta' klorin residwu (jekk ġie mkejje) karbon organiku totali, suspended solids, salinità tal-mezz ittestjat (jekk ġie mkejje) u kwalunkwe qies ieħor,
- kwalità ta' l-ilma fir-reċipjenti tat-test: pH, solidità, temperatura u konċentrazzjoni ta' ossiġnu mahlul.

2.3.4. Riżultati:

- riżultati minn studji preliminary fuq l-istabilità tas-sustanza ittestjata,
- xieħda li l-kontrolli jikkorrispondu ma' l-istandard ta' sopravivenza aċċettabbli ta' l-ispeċi ittestjati (Appendiċi 2 u 3),
- data fuq mortalità/sopravivenza fl-istadju ta' embrijun u larva kif ukoll mortalità u sopravivenza komplessiva,
- granet biex ifaqqsu u kwantità
- granet biex ifaqqsu u kemm faqqsu – data għal tul (u piż),
- incidenza u deskrizzjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi, jekk jeżistu,
- incidenza u deskrizzjoni ta' effetti ta' mġieba, jekk jeżistu,
- analiżi statistika u trattament tad-data,
- għal testijiet li użaw l-ANOVA, l-inqas konċentrazzjoni b'effetti sinjifikanti (LOEC) $F'P=0,05$ f' konċentrazzjoni massima mingħajr effetti sinjifikattivi (NOEC) għal kull risposta analizzata, inkluż deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi utilizzati u indikazzjoni ta' l-entità ta' l-effett li seta' ġie individwat,

▼B

- għal testijiet li użaw it-teknika rigressiva, I-LC/ECx u intervalli ta' kunfidenza u deskrezzjoni grafika tal-mudell użat għall-kalkolazzjoni tiegħu,
- spjegazzjoni għal kull devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ittestjar.

3.

REFERENZI

- (1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). it-temperatura Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature review. J. Biol. 10, pp. 121-173.
- (6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.
- (8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.
- (9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.
- (10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.
- (14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

- (15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, pp. 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Test Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon and Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.
- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, pp. 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comparative methods. *Proc. Royal Society of London, Series B*, 252: pp. 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, pp. 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Pocccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10, pp. 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E. K. (1985). *Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives*, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., *Fish Physiology*, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

*Tabella 1A***Speċi ta' hut rakkomandat għat-test**

Ilma Helu

Oncorhynchus mykiss
Rainbow trout (9)(16)

Danio rerio
Zebrafish (7)(17)(18)

Cyprinus caprio
Karpjun komuni (8)(19)

Oryzias latipes
Japanese ricefish/Medaka (20)(21)

Pimephales promelas
Fathead minnow (8)(22)



Tabella 1B

Eżempji ta' speċi ohra dokumentati tajjeb li ġew użati

Ilma Helu	Ilma Mielah
<i>Carassius auratus</i> Goldfish (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill (8)	<i>Clupea harengus</i> Herring (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Merluzz (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (23)(24)(25)



ANNEX I

GWIDA FUQ IL-PRESTAZZJONI TA' TEST TA' TOSSICITÀ FUQ EMBRIJONI U SAC-FRY TA' ZEBRAFISH (*BRACHYDANIO RERIO*)

DAHLA

Iż-zebrafish toriġina mill-kosta ta' Coromandel fl-Indja fejn tgħix fi xmajjar b'kurrent mghaġġel ta' ilma. Hija huta komuni ta' l-akwarju li tappartjeni għall-familja tal-carp, u informazzjoni dwar il-proċeduri għal ħarsien u l-kultura tagħha tista' tinstab f'kotba standard dwar hut tropikali. Il-bijoloġija u l-użu tagħha għal riċerka ta' sajd kienu riveduti minn Laale (1).

Il-huta rari tkun itwal minn 45 mm. Il-ġisem hu ta' forma ċilindrika b' 7-9 strixxi orizzontali ta' lewn blu skur argentat. Dawn l-istrixxi jkopru l-ġwienah tal-ġenb u ta' wara. Id-dahar huwa ta' lewn aħdar kulur iż-żebbuġa. L-irġiel huma rqaq min-nisa. In-nisa ileqqu aktar u zaqqhom hi aktar mitluqa partikolarment qabel ma jbidu.

Il-hut adult hu kapaċi jittollera varjazzjonijiet kbar fit-temperatura, pH u ebusija. Madankollu, għandhom ikunu provduti kondizzjonijiet ottimali biex ikun hemm hut f'saħħtu li jipproduċi bajd ta' kwalità.

Waqt li l-mara tkun qed tbid, ir-raġel jiġri warajha u jiha bir-ras, u l-bajd ikun fertilizzat hekk kif ikun ħiereġ. Il-bajd, li hu trasparenti u ma jwāħħalx, jaqgħu fil-qiegħ fejn jistgħu jiġu mittiekla mill-ġenituri stess. Il-proċess ta' meta l-huta tbejjed jiġi influwenzat mid-dawl. Jekk id-dawl ta' filghodu jkun adattat, il-hut ġeneralment ibejjed fis-siġħat bikrin ta' wara s-sebh.

Ta' kull ġimgha, mara tista' tipproduċi lottijiet ta' diversi mijiet ta' bajd.

KONDIZZJONIJET TA' HUT RIPRODUTTIV, RIPRODUZZJONI U STADJI TAL-BIDU TAL-HAJJA

Aghzel numru adegwat ta' hut f'saħħtu u zommhom f'ilma adattat (eż. Appendiċi 4) almenu għal ġimghatejn qabel it-tqegħid ta' bajd proġettat. Il-grupp ta' hut għandu jithalla jirriproduċi ta' l-anqas darba qabel ma jipproduċu il-lott ta' bajd użat fit-test. Id-densità ta' hut f'dan il-perjodu ma jridx ikun aktar minn gramma ta' hut għal kull litru. Tibdil regolari ta' l-ilma jew l-użu ta' sistemi ta' purifikazzjoni jippermettu li din id-densità tkun oġhla. It-temperatura fit-tankijiet li qed jinżammu fihom għandha tinżamm sa 25 ± 2 °C. Il-hut għandu jkollu dieta varjata, li tista' tikkonsisti minn per eżempju ikel kummerċjali niexef, *Artemia* mfaqqsa friska, chironomids, *Daphnia*, dud abjad (*Enchytraeids*).

Żewġ proċeduri li fil-prattika wasslu għal-lott suffiċjenti ta' bajd f'saħħtu u fertilizzat sabiex ikun kondott test huma spjegati hawn taht:

Tmien nisa u 16-il raġel huma mitfugħa f'tank l-i fih 50 litru ta' ilma għat-tahlit, protett minn dawl dirett u mitluqa kemm jista' jkun mingħajr ma jiġu disturbati għal almenu 48 siegħa. Tilar biex fih isir it-tqegħid ta' bajd huwa mqiegħed fil-qiegħ ta' l-akwarju wara nofsinhar fil-ġurnata ta' qabel jibda t-test. Dan it-tilar jikkonsisti fi gwarniċ (ħġiegħ plexi jekk materjal adattat ieħor), għoli 5-7 ċm u b'xibka harxa ta' 2-5 mm mwahħla ma' fuq u xibka fina ta' 10-30 μm mal-qiegħ. Max-xibka l-harxa nsibu diversi "siġar tat-tqegħid ta' bajd", magħmulin minn habel tan-najlon mahlul. Wara li l-hut ikunu thallew fid-dlam għal 12-il siegħa, jinxteghel dawl baxx biex jingħata bidu għat-tqegħid ta' bajd. 2-4 siġħat wara it-tqegħid ta' bajd, it-tilar li fih ibidu jitneħħa u jingħabru l-bajd. Dan it-tilar iċaħhad il-hut milli jieklu l-bajd u jiffaċilita wkoll il-ġbir tal-bajd. Il-grupp ta' hut għandhom ikunu biedu ta' l-inqas darba qabel it-tqegħid ta' bajd li jintuza fit-test.

▼B

5-10 ħutiet maskili u femminili huma mqieghda individwalment ta' l-inqas gimghatejn qabel it-tqeghid ta' bajd. Wara 5-10 ijiem, iż-zaqq tan-nisa tkun tidher mitluqa u il-papillae genitali tagħhom ikunu vizibbli. Hut maskili m'għandhomx papillae. It-tqeghid ta' bajd isir f'tankijiet apposta armati b'xibka falza fil-qiegh (kif deskritt hawn fuq). It-tank hu mimli b'ilma għat-taħlit, sabiex il-fond ta' l-ilma 'il fuq mix-xibka jkun ta' 5-10 cm. Mara waħda u żewġt irġiel huma mqieghda fit-tank ġurnata qabel it-tqeghid pjanat. It-temperatura ta' l-ilma tiżdied gradwalment bi grad wiehed għola mit-temperatura akklimatizzanti. Id-dawl jintefa u possibilmment it-tank jithalla minghajr ma jkun disturbat kemm jista' jkun. Filghodu jinxteghel dawl baxx sabiex jinbed it-tqeghid ta' bajd. Sa 2-4 sigħat wara il-hut jitneħħa u l-bajd jingabar. Jekk ikun hemm bżonn ta' lottijiet ikbar ta' bajd minn dak l-ammont li tista' tipproduċi mara waħda, allura jistgħu jiġu preparati numru suffiċjenti ta' tankijiet għat-tqeghid ta' bajd fl-istess hin. Meta is-suċċess tar-riproduzzjoni ta' nisa individwali qabel it-test (daqs tal-lott u l-kwalità)jiġi dokumentat, dawk in-nisa bl-għola rata ta' suċċess riproduttiv, jistgħu ikunu magħżula għar-riproduzzjoni.

Il-bajd għandhom ikunu trasferiti għal ġor-reċipjenti tat-test permezz ta' tubi tal-ħġieġ (id-dijometru minn ġewwa m'għandux ikun inqas minn 4mm) fornuti bi flexible suction bulb. L-ammont ta' ilma li fih jitpoġġew il-bajd biex jiġu trasferiti għandu jkun minimu kemm jista' jkun. Il-bajd huma itqal mill-ilma u jistgħu johorġu minn ġot-tubi. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat li l-bajd (u l-larva) jiġu f'kuntatt ma' l-arja. Għandu jsir eżami mikroskopiku tal-kampjun(i) tal-lott(i) sabiex jiġi żgurat li m'hemm l-ebda irregolarità fl-ewwel stadji ta' l-iżvilupp. Diżinfizzjoni tal-bajd mhux permess.

Ir-rata ta' mwiet fost il-bajd tkun l-ogħla fl-ewwel 24 siegħa wara l-fertilizzazzjoni. Mortalità ta' 5-40 % hi normali f'dan il-perjodu. Il-bajd jiddegenera bħala riżultat ta' falliment fil-fertilizzazzjoni jew fl-iżvilupp. Il-kwalità tal-lott jiddependi fuq il-hut nisa billi certu nisa jipproduċu bajd ta' kwalità tajba filwaqt li oħrajn qatt ma jipproduċu bajd ta' kwalità. Anke ir-rata ta' iżvilupp u r-rata ta' tfaqqis tvarja minn lott għall-iehor. Il-bajd fertilizzat b'suċċess u l-membrana li tagħlaq go fiha l-isfar tal-bajd jgħixu sew, normalment 'il fuq minn 90 %. F'25 °C il-bajd ifaqqs 3-5 ijiem wara l-fertilizzazzjoni u l-membrana li tagħlaq go fiha l-isfar tal-bajd tkun assorbita bejn wiehed u iehor 13-il ġurnata wara l-fertilizzazzjoni.

L-iżvilupp embrijoniku kien definit tajjeb minn Hisaoka u Battle (2). Minhabba it-trasparenza tal-bajd u tal-larva wara it-tfaqqis, jista' jiġri li l-iżvilupp tal-hut ikun segwit minn preżenza ta' malformazzjonijiet. Bejn wiehed u iehor erba' sigħat wara it-tqeghid ta' bajd, il-bajd mhux fertilizzat ikun jingħaraf minn dak fertilizzat (3). Għal dan l-eżami, il-bajd u l-larva jitpoġġew f'kompartamenti b'volum baxx u studjati taħt mikroskopju.

Il-kondizzjonijiet tat-test, li japplikaw għall-istadji ta' bidu tal-ħajja huma mnizzla f'Appendiċi 2. Valuri ottimali tal-pH u ta' l-ebusija ta' l-ilma tat-taħlit huma 7,8 u 250 mg CaCO₃/l rispettivament.

KALKOLAZZJONIJET U STATISTIKA

Hu propost metodu b'zewġ stadji. L-ewwel, id-data fuq il-mortalità, żvilupp anormali u l-hin tat-tfaqqis huma analizzati statistikament. Wara, it-tul tal-ġisem ta' dawk il-koncentrazzjonijiet f'liema ma kien hemm l-ebda effett kuntrarju fuq l-ebda minn dawn il-parametri, hu evalwat statistikament. Dan l-approċċ huwa rakkomandat billi it-tossikant jista' joqtol hut iżgħar, itawwal il-hin għat-tfaqqis u jwassal għal malformazzjonijiet kbar u sussegwentement jinfluenza il-kejl ta' tul. F Barra minn dan, ser ikun hemm bejn wiehed u iehor l-istess ammont ta' hut biex ikunu mkejla għal kull trattament, sabiex tiġi assigurata il-validità ta' l-istatistika tat-test.

▼B**DETERMINAZZJONIJIET TA' L-LC₅₀ U EC₅₀**

Il-persentaġġ ta' bajd u larva sopravvienti huwa kalkolat u tiġi koreġuta abbażi tal-mortalità fil-kontrolli skond il-formola ta' Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

billi,

P = % ta' sopravivenza korretta

P' = % ta' sopravivenza osservata fil-koncentrazzjoni tat-test

C = % sopravivenza fil-kontroll

Jekk hu possibbli, l-LC₅₀ tiġi determinata b'metodu adattat fi tmiem it-test.

Jekk hi mixtieqa l-inkluzjoni ta' anormalitajiet morfologiċi fl-istatistika ta' l-EC₅₀, wiehed jista' jsib gwida għal dan fi Stephan (5).

STIMA TA' LOEC U NOEC

L-għan tat-test fuq il-bajd u s-sac-fry huwa li jqabbel konċentrazzjonijiet diversi miz-zero mal-kontroll, u allura jiġi determinat l-LOEC. Għalhekk għandhom jiġu utilizzati diversi proċeduri ta' tqabbil (6) (7) (8) (9) (10).

REFERENZI

- (1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.
- (2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrafärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.
- (4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.
- (5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.
- (6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statis. Assoc., 50, pp. 1096-1121.
- (7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.
- (8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.
- (9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.
- (10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

KONDIZZJONIJIET TAT-TEST, DEWMIEN U KRITERJI TA' SOPRAVIVENZA GHAL SPEĊI RAKKOMANDATI

Speċi	Temp (°C)	Salinità (0/00)	Fotoper jod (sigħat) (hrs)	Dewmien fl-istadji (ġranet)		Dewmien tipiku tat-test	Sopravivenza tal-Kontroll (% minimu)	
				embrijo	Sac-fry		Suċċess fit-tfaqqis	Perjodu ta' wara t-tfaqqis
ILMA HELU								
<i>Brachydanio rerio</i> Zebrafish	25 ± 1	—	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Appena wara l-fertilizzazzjoni (fil-bidu ta' l-istadju tal-gastrula) sa hamest ijiem wara it-tfaqqis (8-10 ijiem)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Rainbow trout	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	—	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	Appena possibbli wara il-fertilizzazzjoni (fil-bidu ta' l-istadju tal-gastrula) sa 20 ġurnata wara t-tfaqqis (50-55 ġurnata)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Karpjun komuni	21 – 25	—	12 – 16	5	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (8-9 ġranet)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Japanese ricefish/Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 5 ijiem wara it-tfaqqis (13-16-il ġurnata)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow	25 ± 2	—	16	4 – 5	5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqis (8-9 ġranet)	60	70

⁽¹⁾ Għall-embrijoni.⁽²⁾ Għall-larvae.^(a) Dlam għall-embrijoni u għall-larvae sa ġimġha wara t-tfaqqis hlief meta jkunu spezzjonati. Imbagħad dawl baxxa matul it-test.

ANNEX 3

Kondizzjonijiet tat-test, dewmien u kriterji għal sopravivenza ta' speċi ohra dokumentati tajjeb

Speċi	TEMP (°C)	Salinità (0/00)	Fotoperjod (sighat) (hrs)	Dewmien fl-istadji (ġranet)		Dewmien tipiku tat-test	Sopravivenza tal-Kontroll (% minimu)	
				embrijo	SAC-FRY TEST		Suċċess tat-tfaqqs	Wara t-tfaqqs
ILMA HELU								
<i>Carassius auratus</i> Goldfish	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqs (7 ġranet)	—	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4 ijiem wara it-tfaqqs (7 ġranet)	—	75
ILMA MIELAH								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside	22 -25	15 – 22	12	1,5	10	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 5 ijiem wara it-tfaqqs (6-7 ġranet)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Herring	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 3 ijiem wara it-tfaqqs (23-27 ġranet)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Cod	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 3 ijiem wara it-tfaqqs (18-il ġurnata)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow	25 ± 1	15 – 30	12	—	—	Appena possibbli wara l-fertilizzazzjoni (kmieni fl-istadju tal-gastrula) sa 4/7 ijiem wara it-tfaqqs (28 ġurnata)	> 75	80



ANNEX 4

**XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA GHAT-TAHLIT
AĊĊETTABBLI**

Sustanza	Konċentrazzjoni
Materja ta' partiċelli	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonja mhix ionizzata	< 1 µg/l
Klorina residwali	< 10 µg/l
Pesticidi organophosphorus totali	< 50 ng/l
Pesticidi organophosphorus totali u polychlorinated biphenyls	< 50 ng/l
Klorina organika totali	< 25 ng/l



C.16. NAHAL – PROVA TA' TOSSICITÀ ORALI AKUTA

1. METODU

Dan il-metodu ta' prova ta' tossicità akuta huwa replika ta' l-OECD TG 213 (1998).

1.1. DAHLA

Din il-prova ta' tossicità hija metodu li tintuża fil-laboratorju, magħmul biex issir stima tat-tossicità orali akuta tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti u kimiċi oħra, lin-naħal adult li jkun qiegħed jahdem.

Fl-istima u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' tas-sustanzi, d-determinazzjoni ta' tossicità akuta orali fin-naħal tista' tkun meħtieġa, e.ż. meta jkun probabbli li n-naħal għe espost għal xi kimika. Din il-prova ta' tossicità orali akuta ssir sabiex tiġi determinata it-tossicità intrinsika ta' pestiċidi u kimiċi oħra għan-naħal. Ir-risultati ta' din il-prova għandhom jintużaw biex jiġi definit il-bżonn għal evalwazzjoni ulterjuri. B'mod partikolari, dan il-metodu jista' jintuża f'programmi mqassma f'aktar minn fażi wahda sabiex jiġu determinati il-hsarat tal-pestiċidi għan-naħal, ibbażat fuq sekwenza ta' provi ta' tossicità għol-laboratorju għal-esperimenti fuq is-semi-kamp u fuq il-kamp (1). Il-pestiċidi jistgħu jiġu ittestjati bħala sustanzi attivi (s.a.) jew bħala prodotti fformulati.

L-istandard tossiku għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi vverifikata s-sensittività tan-naħal u l-preċiżjoni tal-prova proċedurali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossicità orali akuta: hija l-effett avvers li jseħh f'perjodu massimu ta' 96 siegħa (s) ta' amministrazzjoni orali ta' dosa singola ta' sustanza sperimentali.

Doża: hija l-ammont tas-sustanza ikkonsmata. Id-doża hija espressa bħala l-massa (µg) tas-sustanza sperimentali għal kull animal sperimentali (µg/bee). L-ammont reali għal kull naħla ma jistax jiġi kkal-kolat peress li n-naħal jintema' kollettivament, imma tista' ssir stima tad-doża medja (it-total tas-sustanza sperimentali kkonsumata/in-numru ta' naħal sperimentali f'kull gaġġa).

LD₅₀ (doża letali medja) orali: hija doża singola ta' sustanza miġjuba statistikament li tista' tikkawża l-mewt f'50 % ta' l-annimali meta tiġi somministrata oralment. Il-valur ta' l-LD₅₀ huwa espress bħala µg tas-sustanza sperimentali kull naħla. Fil-każ tal-pestiċidi, is-sustanza sperimentali tista' tkun kemm sustanza attiva (s.a.) kif ukoll prodott formulat li jkunu fih wiehed jew aktar sustanzi attivi.

Mortalità: animal huwa registrat mejjet meta ikun kompletament immobbli.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-PROVA

Naħal haddiema adulti (*Apis mellifera*) huma esposti għal firxa ta' dożijiet tas-sustanza sperimentali imferrxa f'soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal imbagħad jintema' bl-istess dieta, libera mis-sustanza sperimentali. Matul mill-anqas 48 s il-mortalità tiġi registrata kull jum u pparagunata mal-valur tal-kontroll. Jekk ir-rata tal-mortalità tkun qed tiżdied bejn 24 s u 48 s filwaqt illi l-mortalità tal-kontrolli tibqa' fl-ivell aċċettabbli, i.e. <= 10 %, ikun xieraq illi l-prova tiġi estiża għal massimu ta' 96 s. Ir-risultati jiġu analizzati sabiex jiġi kkalkulat l-LD₅₀ fl-24 s u t-48 s u, fil-każ li l-istudju jiġi pprolongat, fit-72 s u fis-96 s.

▼B

1.4. VALIDITÀ TAL-PROVA

Sabiex prova tkun valida, japplikaw l-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità medja għan-numru totali ta' kontrolli m'għandiex teċċedi 10 % fl-aħħar tal-prova,

— l-LD₅₀ ta' l-istandard tossiku jilhaq il-firxa speċifikata.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-PROVA

1.5.1. **Kollezzjoni ta' naħal**

Jintużaw naħal haddiema żagħżagħ adulti ta' l-istess razza, i.e. naħal ta' l-istess età, mitmugħa bl-istess mod, eċċ. In-naħal għandu jinkiseb minn kolonji li għandhom reġina, li huma mitmugħin tajjeb, u sakemm dan ikun possibbli, li jkunu eżenti minn mard, bi storja u stat fiżjologiku magħruf. Jistgħu jiġu miġbura filgħodu l-jum tal-prova jew filgħaxija ta' qabel il-prova u miżmuma fil-kondizzjonijiet tal-prova sal-għurnata ta' wara. Jistgħu jintużaw ukoll naħal miġbura minn għamliet bla duqqajs. Għandu jiġi evitat l-ġbir fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-harifa peress illi matul dan iż-żmien n-naħal ibiddel l-istat fiżjologiku tiegħu. Jekk il-provi ikollom jsiru fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-harifa, in-naħal jistgħu jitqegħdu f'inkubatur u mrobbija għal gimgha b'“hobz tan-naħal” (pollinu miġbur mix-xehdiet) u soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal li jiġi trattat b'sustanzi kimiċi, bħal m'huma antibiotiċi, prodotti anti-varroa, eċċ., m'għandux jintuża għal provi ta' tossiċità qabel erba' gimghat mit-tmiem ta' l-aħħar trattament.

1.5.2. **Kondizzjonijiet ta' manteniment u alimentazzjoni**

Jintużaw gaġġeġ li jitnaddfu faċilment u li għandhom ventilazzjoni tajjba. Kull materjal xieraq jista' jintuża, e.ż. azzar stainless, xbieki tal-hadid, plastik jew gaġġeġ ta' l-injam disposable, eċċ. In-numru idejali huwa ta' gruppi ta' għaxar naħliet f'kull gaġġa. Il-qies tal-gaġġeġ sperimentali għandu jkun xieraq għan numru ta' naħal, i.e. jipprovdni spazju adegwat.

In-naħal għandu jinżamm fid-dlam ġewwa kamra sperimentali f'temperatura ta' 25 ± 2 °C. L-umdità relattiva, normalment madwar 50-70 %, għandha tiġi reġistrata matul il-prova kollha. Proċeduri ta' manipolazzjoni, inklużi t-trattamenti u l-osservazzjonijiet jistgħu jsiru fid-dawl (naturali). L-alimentazzjoni tikkonsisti f'soluzzjoni ta' sukrosju fl-ilma b'koncentrazzjoni finali ta' 500 g/l (50 % w/v). Wara li jingħataw id-dożii sperimentali, l-alimentazzjoni għandha tingħata *ad libitum*. Is-sistema ta' alimentazzjoni għandha tħalli ssir reġistrazzjoni ta' kemm jiġi kkonsmat ikel f'kull gaġġa (ara taqsima 1.6.3.1). Tista' tintuża pipetta tal-ħġieġ (madwar 50 mm twila u 10 mm wiesgħa bin-naħa l-miftuħa li tidjiegħ għal djametru ta' madwar 2 mm).

1.5.3. **Preparazzjoni tan-naħal**

In-naħal miġbur jiġi allokat saltwarjament f'gaġġeġ sperimentali, li mbagħad jitpoġġew saltwarjament fil-kamra sperimentali.

▼B

Qabel ma tibda l-prova in-naħal jista' jithalla bla ikel għal hin massimu ta' 2 s. Huwa rakkomandat li n-naħal jithalla bla ikel qabel it-trattament sabiex fil-bidu tal-prova in-naħal kollu jirriżulta ugwali f'termini tal-kontenut intestinali. Qabel ma tinbeda l-prova jehtiegħ illi jitneħħa n-naħal li jkun qiegħed imut u li jiġi sostitwit b'naħal b'saħħtu.

1.5.4. Preparazzjoni tad-dożi

Meta s-sustanza sperimentali tkun wahda li tista' tithallat ma' ilma, din tista' tithallat direttament f'50 % soluzzjoni tas-sukrosju. Għal prodotti u sustanzi oħra tekniċi li ma jinhallux daqshekk malajr fl-ilma, jistgħu jintużaw vetturi oħra bħal solventi organiċi, emulsifiers jew dispersants li għandhom livell ta' tossiċità baxxa għan-naħal (e.ż. acetone, dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Il-konċentrazzjoni tal-vettura tiddependi fuq is-solubilità tas-sustanza sperimentali li għandha tkun l-istess għal konċentrazzjonijiet kollha li ssirillhom il-prova. Madankollu, konċentrazzjoni tal-vettura ta' madwar 1 % hija ġeneralment xierqa u m'għandhiex tkun għola.

Sustanzi xierqa għall-kontroll għandhom jitlestew, i.e. meta solvent jew dispersant jintuza biex iħoll is-sustanza sperimentali, għandhom jintużaw żewġ gruppi ta' soluzzjoni fl-ilma, u soluzzjoni ta' sukrosju li jkollha s-solvent/trasportatur bil-konċentrazzjoni użata fis-soluzzjonijiet dozi.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. Gruppi sperimentali u gruppi għall-kontroll

In-numru ta' dozi u ta' repliċi ttestjati għandhom ikunu konformi mar-rekwiżiti statistiċi għad-determinazzjoni ta' l-LD₅₀ mal-limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Normalment, għal-prova jehtieġu hames dozi f'serie ġeometrika, b'fatturi li ma jaqbūx 2.2, u li jkopru l-firxa għall-LD₅₀. Madankollu, għandhom jiġu determinati l-fattur tat-tahlit ma' l-ilma u n-numru ta' konċentrazzjonijiet għad-dozi b'relazzjoni ma' kemm tkun immedja l-kurva tat-tossiċità (doża kontra mortalità) u għandu jiġi ikkunsidrat il-metodu statistiku li gie magħżul għall-analiżi tar-riżultati. Prova ta' ricerka fuq il-firxa tippermetti li jintgħazlu l-konċentrazzjonijiet appropjati għad-dozi.

Minimu ta' tlett gruppi ta' provi repetuti, kull wieħed ta' tliet nahliet, għandu jiġi dozat b'kull konċentrazzjoni sperimentali. Oltre s-serje sperimentali hu neċessarju li jiġu analizzati minimu ta' tliet lottijiet ta' kontroll, kull wahda ta' 10 nahliet. Huma mehtieġa tliet gruppi ta' kontroll anke għal solventi/trasportaturi użati (ara taqsima 1.5.4).

1.6.2. Sustanza tossika standard

Fis-serje sperimentali għandha tiġi inkluża sustanza tossika standard. Jehtieġ li jintgħazlu mill-anqas tlett dozi li jkopru l-valur mistenni ta' LD₅₀. Għal kull doża sperimentali jintużaw mill-inqas tlett gaġġeg repliċi, kull wahda fiha għaxar nahliet. Is-sustanza tossika standard preferuta hija d-dimethoate, fejn l-LD₅₀-24 s orali rrapurtat huwa fil-firxa ta' 0,10- 0,35 µg s.a./nahla (2). Madankollu, huma ukoll aċċettabbli sustanzi tossiċi standard oħra jekk data suffiċenti tkun tista' tingieb sabiex tiġi vverifikata r-risposta mistennija rigward id-dozi (e.ż. parathion).

▼B**1.6.3. Espożizzjoni****1.6.3.1. Somministrazzjoni tad-dożi**

Kull grupp sperimentali ta' naħal għandu jirċievi 100-200 µl soluzzjoni tas-sukrosju ġo l-ilma ta' 50 %, li jkunu jinsabu fiha s-sustanza in eżami bil-konċentrazzjoni xierqa. Għal dawk il-prodotti li jdumu ma jinħallu fl-ilma, li għandhom livell ta' tossiċità baxx jew li għandhom livell ta' konċentrazzjoni baxx fil-formulazzjoni, huwa meħtieġ volum akbar peress illi jkunu jridu jintużaw proporzjonijiet għola fis-soluzzjoni tas-sukrosju. Il-monitoraġġ tal-kwantità ta' ikel trattat li jiġi ikkonsmat minn kull grupp hu neċessarju. Galadarba jittiekel (normalment f'3-4 s), il-kontenitur ta' l-ikel għandu jitneħħa minn ġol-gaġġa u mibdul b'kontenitur li jkun fih biss is-soluzzjoni tas-sukrosju. Is-soluzzjonijiet tas-sukrosju huma mbaġħad provduti *ad libitum*. Għal xi sustanzi li jkollhom konċentrazzjoni elevata hu possibbli li n-naħal jirrifjuta l-ikel trattat. Wara hin massimu ta' 6 s, l-ikel trattat li ma jiġix ikkonsmat għandu jinbidel b'soluzzjoni ta' sukrosju biss. Stima ta' l-ikel trattat ikkonsmat hija neċessarja (e.ż. kejl tal-volum/piż ta' l-ikel trattat li jkun fadal).

1.6.3.2. Tul ta' żmien

Preferibbilment, il-prova għandha ddum 48 s mill-mument meta s-soluzzjoni sperimentali tiġi sostitwita b'soluzzjoni ta' sukrosju biss. Jekk il-mortalità tkompli tghola għal aktar minn 10 % wara l-ewwel 24 s, d-durata tal-prova għandha tiġi estiza għal massimu ta' 96 s sakemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

1.6.4. Osservazzjonijiet

L-mortalità tiġi reġistrata 4 s wara li tibda l-test u sussegwentement wara 24 s u wara 48 s (i.e. wara li tingħata d-doża). F'każ li l-perjodu ta' osservazzjoni jiġi pprolongat jeħtieġ li jkun hemm valutazzjonijiet ohra f'intervalli ta' 24 s sa hin massimu ta' 96 s, CASemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbiżx 10 %.

Għandu jkun hemm stima ta' l-ikel ikkonsmat minn kull grupp. Pargun bejn ir-rati ta' konsumazzjoni ta' ikel trattat u dak mhux trattat matul is-6 s imsemmija jista' jipprovdi informazzjoni dwar il-palatabilità ta' l-ikel trattat.

Hu neċessarju li jiġu reġistrati l-anomaliji kollha fl-imġieba osservata matul il-prova.

1.6.5. Prova limiti

F'certu każijiet (e.ż. meta jkun mistenni illi sustanza sperimentali jkollha tossiċità baxxa) tista' ssir prova limiti bl-użu ta' 100µg s.a./naħla sabiex jintwera illi l-LD₅₀ huwa akbar minn minn dan il-valur. L-istess proċedura għandha tintuża, inkluzi t-tliet gruppi repliċi, għad-doża sperimentali, għall-kontrolli rilevanti, għall-istima ta' l-ammont ta' ikel ikkonsmat, u għall-użu ta' l-istandard tossiku. Jekk isehħu każijiet ta' mortalità, irid isir studju komplet. Jekk jiġu osservati effetti subletali (ara taqsima 1.6.4), dawn għandhom jiġu reġistrati.

▼B**2. DATA U RAPURTAĠĠ****2.1. DATA**

Id-*data* għandha tiddahħal fil-qosor f'tabella li turi n-numru ta' naħal użat kif ukoll il-mortalità f'kull osservazzjoni u n-numru ta' naħal b'imġieba anomala għal kull grupp ta' trattament, ta' kontroll u relattiv għas-sustanza tossika standard. Sabiex tiġi analizzata d-*data* tal-mortalità jehtieg li jintużaw metodi statistiċi xierqa (e.ż. analiżi probit, medja mobbli, probabbiltà binomali) (3) (4). Jehtieg li jiġu mpinġija kurvi doża-twegiba għal kull żmien ta' osservazzjoni rakkomandat u li tiġi kkalkolata l-mejla tal-kurvi u d-dożi letali medji (LD₅₀) b'limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Il-korrezzjonijiet għall-mortalità bejn il-kontrolli jistgħu jiġu effettwati skond il-metodu ta' Abbott (4) (5). Meta l-ikel trattat ma jiġix ikkonsmat totalment, għandha tiġi determinata d-doża tas-sustanza sperimentali kkonsmata f'kull grupp. Il-LD₅₀ għandha tiġi espressa f'ig tas-sustanza sperimentali kull naħla.

2.2. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. Sustanza sperimentali:

- natura fiżika u propjetà fiżjokimika rilevanti (e.ż. stabbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar),
- data kimika ta' identifikazzjoni, inkluża formula ta' struttura, purezza (i.e. għall-pestiżidi, l-identità u l-koncentrazzjoni ta' sustanza(/i) attiva(/i)).

2.2.2. Speċi sperimentali:

- isem xjentifiku ta' l-ispeċi, razza, età approssimattiva (f'gimghat), metodu u data tal-ġabra,
- informazzjoni fuq kolonji użati għall-ġbir tan-naħal għall-isperimentazzjoni inkluż is-saħħa, eventwali mard ta' l-eżemplari adulti, eventwali pretrattamenti, eċċ.

2.2.3. Kondizzjonijiet sperimentali:

- temperatura u umdità relattiva tal-kamra sperimentali,
- kondizzjonijiet tal-housing inklużi t-tip, il-qies u l-materjal tal-gaġġa,
- metodi tal-preparazzjoni tar-riżerva u tas-sustanza sperimentali (meta jintuża, is-solvent u l-koncentrazzjoni tiegħu għandha tingħata), metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tar-riżerva u l-frekwenza tat-tiġdid (meta jintuża, l-aġent li jholl u l-koncentrazzjoni tiegħu għandha tingħata),
- disinn sperimentali, e.ż. numru u konċentrazzjonijiet sperimentali użati, numru ta' kontrolli; għal kull konċentrazzjoni sperimentali u kontroll, numru ta' repliċi ta' gaġġeġ u numru numru ta' naħal f'kull gaġġa,
- data tal-prova.

▼B**2.2.4. Riżultati:**

- riżultati ta' l-istudju preliminari tar-riċerka tal-firxa, jekk magħmul,
- *data* primarja: mortalità għal kull doża ttestjata f'kull hin ta' osservazzjoni,
- grafika tal-kurvi doża-tweġiba fl-aħħar tal-prova,
- valuri ta' l-LD₅₀ b'limiti ta' affidabilità with 95 %, għal kull hin rakkomandat għall-osservazzjoni għas-sustanza tal-prova u għas-sustanza tossika standard,
- proċeduri statistiċi użati biex jistabilixxu l-LD₅₀,
- mortalità bejn il-kontrolli,
- effetti oħra bioloġiċi osservati jew imkejla e.ż. mgieba anomala tan-naħal (inkluż ir-rifjut tad-doża sperimentali), rata tal-konsumazzjoni ta' l-ikel f'gruppi trattati u gruppi mhux trattati,
- devjazzjoni eventwali mill-proċedura tal-metodu sperimentali hawn deskritti u informazzjoni eventwali oħra rilevanti.

3. REFERENZI

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B**C.17. NAHAL – PROVA TA' TOSSICITÀ AKUTA MILL-KUNTATT****1. METODU**

Dan il-metodu ta' prova ta' tossicità akuta huwa replika ta' l-OECD TG 214 (1998).

1.1. DAHLA

Din il-prova ta' tossicità huwa metodu li jintuża fil-laboratorju, magħmul biex issir stima tat-tossicità mill-kuntatt akuta tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti u kimiċi oħra, lin-naħal adult li jkun qiegħed jahdem.

Fl-istima u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi ta' tas-sustanzi, d-determinazzjoni ta' tossicità akuta mill-kuntatt fin-naħal tista' tuckun meħtieġa, eż. meta jkun probabbli li n-naħal jiġi espost għal xi kimika. Din il-prova ta' tossicità mill-kuntatt akuta jsir sabiex tiġi determinata it-tossicità intrinsika ta' pestiċidi u kimiċi oħra għan-naħal. Ir-risultati ta' din il-prova għandhom jintużaw biex jiġi definit il-bżonn għal evalwazzjoni ulterjuri. B'mod partikolari, dan il-metodu jista' jintuża f'programmi mqassma f'aktar minn fażi waħda sabiex jiġu determinati il-hsarat tal-pestiċidi għan-naħal, ibbażat fuq sekwenza ta' provi ta' tossicità għol-laboratorju għal-esperimenti fuq is-semikamp u fuq il-kamp (1). Il-pestiċidi jistgħu jiġu ittestjati bħala sustanzi attivi (s.a.) jew bħala prodotti fformulati.

L-istandard tossiku għandu jiġi stabbilit sabiex tiġi vverifikata s-sensittività tan-naħal u l-preċiżjoni tal-prova proċedurali.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Tossicità orali akuta: hija l-effett avvers li jsehh f'perjodu massimu ta' 96 siegħa ta' applikazzjoni topika ta' dosa singola ta' sustanza sperimentali.

Doża: hija l-ammont tas-sustanza applikata. Id-doża hija espressa bħala l-massa (µg g) tas-sustanza sperimentali għal kull animal sperimentali (µg/bee).

LD₅₀ (doża letli medja) mill-kuntatt: hija doża singola ta' sustanza miġjuba statistikament li tista' tikkawża l-mewt f'50 % ta' l-annimali meta tiġi somministrata mill-kuntatt. Il-valur ta' l-LD₅₀ huwa espress bħala (µg) tas-sustanza sperimentali kull naħla. Fil-każ tal-pestiċidi, is-sustanza sperimentali tista' tkun kemm sustanza attiva (s.a.) kif ukoll prodott formulat li jkunu fih wiehed jew aktar sustanzi attivi.

Mortalità: animal huwa registrat mejjet meta ikun kompletament immobbli.

1.3. PRINĊIPJU TAL-METODU TAL-PROVA

Naħal haddiema adulti (*Apis mellifera*) huma esposti għal firxa ta' dożijiet tas-sustanza sperimentali mahlula f'trasportaturi xierqa, b'applikazzjoni diretta mas-sider (taqtir). Il-prova ddum 48 s. Jekk ir-rata tal-mortalità tkun qed tizdied bejn 24 s u 48 s filwaqt illi l-mortalità tal-kontrolli tibqa' f'livell aċċettabbli, i.e. ≤ 10 %, ikun xieraq illi l-prova tiġi estiża għal massimu ta' 96 s. Il-mortalità għandha tiġi registrata kull jum u pparagunata mal-valur tal-kontrolli. Ir-risultati jiġu analizzati sabiex jiġi kkalkulat l-LD₅₀ fl-24 s u t-48 s u, fil-każ li l-istudju jiġi pprolongat, fit-72 s u fis-96 s.

▼B**1.4. VALIDITÀ TAL-PROVA**

Sabiex prova tkun valida, japplikaw l-kondizzjonijiet li ġejjin:

— il-mortalità medja għan-numru totali ta' kontrolli m'għandux jeċċedi 10 % fl-aħħar tal-prova,

— l-LD₅₀ ta' l-istandard tossiku jilhaq il-firxa speċifikata.

1.5. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAL-PROVA**1.5.1. Kollezzjoni ta' naħal**

Jintużaw naħal haddiema żgħażaġh adulti, i.e. naħal ta' l-istess età, mitmugħa bl-istess mod, ta' l-istess razza eċċ. In-naħal għandu jinkiseb minn kolonji li għandhom reġina, li huma mitmugħin tajjeb, u sakemm dan ikun possibbli, li jkunu eżenti minn mard, b'storja u stat fiżjoloġiku magħruf. Jistgħu jiġu miġbura filgħodu l-jum tal-prova jew filgħaxija ta' qabel il-prova u miżmuma fil-kondizzjonijiet tal-prova sal-gurnata ta' wara. Jistgħu jintużaw ukoll naħal miġbura minn għamliet bla duqqajs. Għandhu jiġi evitat l-ġbir fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-harifa peress illi matul dan iż-żmien n-naħal ibiddel l-istat fiżjoloġiku tiegħu. Jekk il-provi jkollom jsiru fil-bidu tar-rebbiegħa jew fl-aħħar tal-harifa, in-naħal jistgħu jitpoġġew f'inkubatur u mrobbija għal ġimgħa b' "hobż tan-naħal" (pollinu miġbur mix-xehdiet) u soluzzjoni tas-sukrosju. In-naħal li jiġi trattat b'sustanzi kimiċi, bħal m'huma antibiotiċi, prodotti anti-varroa, eċċ., m'għandux jintuża għal provi ta' tossiċità qabel erba' ġimgħat mit-tmiem ta' l-aħħar trattament.

1.5.2. Kondizzjonijiet ta' manteniment u alimentazzjoni

Jintużaw gaġġeġ li jtnaddfu faċilment u li għandhom ventilazzjoni tajba. Kull materjal xieraq jista' jintuża, e.ż. azzar stainless, xbieki tal-hadid, plastik jew gaġġeġ ta' l-injam disposable, eċċ. Il-qies tal-gaġġeġ sperimentali għandu jkun xieraq għan numru ta' naħal, i.e. jipprovi spazju adegwat. In-numru idejali huwa ta' gruppi ta' għaxar naħliet f'kull gaġġa.

In-naħal għandu jinżamm fid-dlam ġewwa kamra sperimentali f'temperatura ta' 25 ± 2 °C. L-umdità relattiva, normalment madwar 50-70 %, għandha tiġi registrata matul il-prova kollha. Proċeduri ta' manipolazzjoni, inklużi t-trattamenti u l-osservazzjonijiet jistgħu jsiru fid-dawl (naturali). L-alimentazzjoni tikkonsisti f'soluzzjoni ta' sukrosju fl-ilma b'konċentrazzjoni finali ta' 500 g/l (50 % w/v) u għandha tingħata *ad libitum* matul iż-żmien tal-prova, permezz ta' kontenitur għall-ikel tan-naħal. Dan jista' jkun pipetta tal-ħġieġ (madwar 50 mm twila u 10 mm wiesgħa bin-naħa l-miftuħa li tidjiegħ għal djametru ta' madwar 2 mm).

1.5.3. Preparazzjoni tan-naħal

In-naħal miġbur jista' jiġi illoppjat b'carbon dioxide jew nitrogen għall-applikazzjoni tas-sustanza sperimentali. L-ammont ta' loppju użat u l-hin ta' espożizzjoni għandu jiġi minimizzat. Qabel ma tinbeda l-prova jehtiegħ illi jitneħħa n-naħal li jkun qiegħed imut u li jiġi sostitwit minn naħal b'saħħithom.

1.5.4. Preparazzjoni tad-dożi

Is-sustanza sperimentali għandha tiġi applikata b'haħha soluzzjoni ġo trasportatur, i.e. solvent organiku jew soluzzjoni bl-ilma b'agent li jxarrab, huwa preferibbli l-acetone imma jistgħu jintużaw ukoll solventi organiċi oħra li għandhom livell ta' tossiċità baxxa għan-naħal (e.ż. dimethylformamide, dimethylsulfoxide). Għal dawk il-prodotti formulati mitlufa fl-ilma u s-sustanzi organiċi altament polari li ma jinħallux f'solventi organiċi jista' jirriżulta aktar faċli biex jiġu applikati jekk preparati f'soluzzjoni debboli ta' agent li jxarrab kummerċjali (e.ż. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Sustanzi xierqa għall-kontroll għandhom jitlestew, i.e. meta solvent jew dispersant jintuza biex iħoll is-sustanza sperimentali, għandhom jintużaw żewġ gruppi ta' gruppi ta' kontroll, wiehed trattat bl-ilma, u wiehed trattat b'is-solvent/id-dispersant.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. Gruppi sperimentali u gruppi għall-kontroll

In-numru ta' dozi u ta' repliċi ttestjati għandhom ikunu konformi mar-rekwiziti statistiċi għad-determinazzjoni ta' l-LD₅₀ mal-limiti ta' affidabilità ta' 95 %. Normalment, għall-prova jehtiegu hames dozi f'serie ġeometrika, b'fatturi li ma jaqbūx 2.2, u li jkopru l-firxa għall-LD₅₀. Madankollu, għandhom jiġu determinati n-numru ta' dozi b'relazzjoni ma' kemm tkun immejla l-kurva tat-tossicità (doża kontra mortalità) u għandu jiġi ikkunsidrat il-metodu statistiku li ġie magħżul għall-analiżi tar-riżultati. Prova ta' ricerka fuq il-firxa tippermetti li jint-ghażlu d-dozi appropjati.

Minimu ta' tlett gruppi ta' provi repetuti, kull wiehed ta' tlett nahliet, għandu jiġi dożat b'kull konċentrazzjoni sperimentali.

Oltre s-serje sperimentali hu neċessarju li jiġu analizzati minimu ta' tlett lottijiet ta' kontroll, kull waħda ta' 10 nahliet. Jekk jintuza solvent organiku jew aġent li jxarrab tlett gruppi ta' kontroll addizzjonali ta' 10 nahliet kull wiehed iridu jiġu inkluzi għas-solvent jew għall-aġent li jxarrab.

1.6.2. Sustanza tossika standard

Fis-serje sperimentali għandha tiġi inkluzi sustanza tossika standard. Jehtieg li jint-ghażlu mill-anqas tlett dozi li jkopru l-valur mistenni ta' LD₅₀. Għal kull doża sperimentali jintużaw mill-inqas tlett gaġġeg repliċi, kull waħda fiha 10 nahliet. Is-sustanza tossika standard preferuta hija d-dimethoate, fejn l-LD₅₀ - 24 s mill-kuntatt rrapurtat huwa fil-firxa ta' 0,10 - 0,35 µg s.a./nahla (2). Madankollu, huma ukoll aċċettabbli sustanzi tossiċi standard oħra jekk data suffiċenti tkun tista' tingħeb sabiex tiġi vverifikata r-risposta mistennija rigward id-dozi(e.ż. parathion).

1.6.3. Espożizzjoni

1.6.3.1. Somministrazzjoni tad-dozi

Nahal illoppjat jiġi trattat individwalment permezz ta' applikazzjoni topika. In-nahal huwa assenjat saltwarjament għad-dozi sperimentali u kontrolli differenti. Permezz ta' mikroapplikatur għandu jiġi applikat volum ta' 1 µl tas-soluzzjoni li jkun fiha s-sustanza sperimentali bil-konċentrazzjoni xierqa fin-naħa tad-dahar tas-sider ta' kull nahla. Jekk ġustifikati, volumi oħra jistgħu jintużaw. Wara l-applikazzjoni, in-nahal jiġi allokati għol-gaġġeg sperimentali u mitmugħa b'soluzzjonijiet tas-sukrosju.

1.6.3.2. Tul ta' żmien

Preferibbilment, il-prova għandha ddum 48 s. Jekk il-mortalità tizdied għal aktar minn 10 % bejn 24 s u 48h, d-durata tal-prova għandha tiġi estiża għal massimu ta' 96 s CASemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbūx 10 %.

▼B**1.6.4. Osservazzjonijiet**

L-mortalità tiġi registrata 4 s wara l-applikazzjoni u sussegwentement wara 24 s u wara 48 s. F'każ li l-perjodu ta' osservazzjoni jiġi pprolongat jehtieg li jkun hemm valutazzjonijiet oħra f'intervalli ta' 24 s sa hin massimu ta' 96 s, sakemm il-mortalità matul il-kontrolli ma jaqbix 10 %.

Hu neċessarju li jiġu registrati l-anomaliji kollha ta' l-imġieba osservata matul il-prova.

1.6.5. Prova limiti

F'ċertu każijiet (e.ż. meta jkun pretiż illi sustanza sperimentali jkollha tossiċità baxxa) tista' ssir prova limiti bl-użu ta' 100 µg s.a./nahla sabiex jintwera illi l-LD₅₀ huwa akbar minn minn dan il-valur. L-istess proċedura għandha tintuża, inklużi t-tlett gruppi repliċi, għad-doża sperimentali, għall-kontrolli rilevanti, u għall-użu ta' l-istandard tossiku. If mortalities occur, a full study should be conducted. Jekk jiġu osservati effetti subletali (ara taqsima 1.6.4), dawn għandhom jiġu registrati.

2. DATA U RAPURTAĠĠ**2.1. DATA**

Id-data għandha tiġi mqassra għo tabella li turi n-numru ta' naħal użat kif ukoll il-mortalità f'kull osservazzjoni u n-numru ta' naħal b'imġieba anomala għal kull grupp ta' trattament, ta' kontroll u relattiv għas-sustanza tossika standard. Sabiex tiġi analizzata d-data tal-mortalità jehtieg li jintużaw metodi statistiċi xierqa (e.ż. analiżi probit, medja mobbli, probabbiltà binomali) (3) (4). Il-kurvi għal *plot dose-response* f'kull hin ta' osservazzjoni rakkomandat (i.e. 24 s, 48 s u, jekk inhu rilevanti, 72 s, 96 s) u kkalkula l-kurvi u l-medja tad-dożi letali (LD₅₀) b'95 % ta' limiti ta' kunfidenza. Il-korrezzjonijiet għall-mortalità bejn il-kontrolli jistghu jiġu effettwati skond il-metodu ta' Abbott (4) (5). Il- LD₅₀ għandha tiġi espressa f'ig tas-sustanza sperimentali kull nahla.

2.2. RAPPORT TAL-PROVA

Ir-rapport tal-prova irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

2.2.1. Sustanza sperimentali:

— natura fiżika u propjetà fiżjo-kimika rilevanti (e.ż. stabbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar),

— data kimika ta' identifikazzjoni, inkluża formula ta' struttura, purezza (i.e. għall-pestizidi, l-identità u l-konċentrazzjoni ta' sustanza(i) attiva(i)).

2.2.2. Speċi sperimentali:

— isem xjentifiku ta' l-ispeċi, razza, età approssimattiva (f'gimghat), metodu u data tal-ġabra,

— informazzjoni fuq kolonnji użati għall-ġbir tan-naħal għall-esperimentazzjoni inkluż is-saħħa, mard eventwali ta' l-eżemplari adulti, eventwali pretrattamenti, eċċ.

▼B**2.2.3. Kondizzjonijiet sperimentali:**

- temperatura u umdità relattiva tal-kamra sperimentali,
- kondizzjonijiet tal-housing inklużi t-tip, il-qies u l-materjal tal-gaġġa,
- metodu ta' amministrazzjoni tas-sustanza sperimentali, e.ż. solvent trasportatur użat, volum tas-soluzzjoni sperimentali applikat, loppju użat,
- disinn sperimentali, e.ż. numru ta' doži sperimentali użati, numru ta' kontrolli; għal kull doża sperimentali u kontroll, numru ta' repliċi ta' gaġġeġ u numru ta' naħal f'kull gaġġa,
- data tal-prova.

2.2.4. Riżultati:

- riżultati ta' l-istudju preliminari tar-riċerka tar-range, jekk magħmul,
- data primarja: mortalità għal kull doża ttestjata f'kull hin ta' osservazzjoni,
- grafika tal-kurvi doża-tweġiba fl-aħħar tal-prova,
- valuri ta' l- LD_{50} b'limiti ta' affidabilità with 95 %, għal kull hin rakkomandat għall-osservazzjoni għas-sustanza tal-prova u għas-sustanza tossika standard,
- proċeduri statistiċi użati biex jistabilixxu l- LD_{50} ,
- mortalità bejn il-kontrolli,
- effetti oħra bioloġiċi osservati jew imkejla e.ż. mġieba anomala tan-naħal,
- eventwali devjazzjoni mill-proċedura tal-metodu sperimentali hawn deskritti u eventwali informazzjoni oħra rilevanti.

3. REFERENZI

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.
- (3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.



C.18. ADSORBIMENT/DESORBIMENT BL-UŻU TAL-METODU TA' L-EKWILIBRIJU TA' GRUPPI

1. METODU

Dan il-metodu huwa replika ta' l-OECD TG 106, għad-Determinazzjoni ta' l-Assorbiment/Desorbiment tal-hamrija, bl-użu ta' Metodu ta' Ekwilibriju ta' Gruppi (2000).

1.1. DAHLA

Fl-elaborazzjoni tal-metodu preżenti, ingħata każ tar-riżultati ta' sperimentazzjoni ċirkolari u ta' workshop għall-ghażla tal-hamrija għall-iżvilupp ta' prova ta' l-adsorbiment (1) (2) (3) (4) kif ukoll linji gwida eżistenti fuq livell nazzjonali (5) (5) (6) (7) (8) (9) (10).

L-istudji fuq l-adsorbiment/desorbiment huma utli sabiex tinkiseb informazzjoni essenzjali fuq il-mobilità tal-komposti kimiċi u d-distribuzzjoni tagħhom fil-hamrija, fl-ilma u fl-arja tal-biosfera (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Din l-informazzjoni tista' tkun utli, pereżempju, sabiex wiehed ikun jista' jobsor jew jagħmel stima tad-disponibbiltà ta' prodott kimiku taħt aspetti varji: degradazzjoni (22) (23), trasformazzjoni u assimilazzjoni ta' l-organizmi haġġin (24); filtrazzjoni minn ġol-profil tal-hamrija (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilità mill-hamrija (21) (29) (30); passaggj mill-wieċ ta' l-art għall-ilmijiet naturali (18) (31) (32). Id-data fuq l-adsorbiment tista' tintuża għall-skopijiet ta' paragonar u ta' mudellar (19) (33) (34) (35).

Id-distribuzzjoni ta' prodott kimiku bejn il-hamrija u fażijiet li fihom l-ilma huwa proċess ikkomplikat li jiddependi fuq numru ta' fatturi differenti: in-natura kimika tas-sustanza (12) (36) (37) (38) (39) (40), il-karatteristiċi tal-hamrija (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), u l-fatturi klimatiċi bħal ma huma l-inżul tax-xita, it-temperatura, id-dawl tax-xemx u r-riħ. Għaldaqstant, il-fenomeni numerużi u l-mekkaniżmi involuti fil-proċess ta' l-adsorbiment tal-hamrija ta' sustanza kimika ma jistgħux jiġu definiti kompletament permezz ta' mudell simplifikat tal-laboratorju bħal m'hu il-metodu preżenti. Madankollu, anke jekk dan l-attentat ma jkunx jista' jkopri l-każijiet ambjentali kollha possibbli, jipprovdi informazzjoni ta' valur fuq ir-rilevanza ambjentali ta' l-adsorbiment ta' sustanza kimika.

Ara ukoll l-Introduzzjoni Ġenerali.

1.2. AMBITU

L-ghan ta' dan il-metodu huwa li jivvaluta l-imġieba ta' l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza fuq il-hamrija. L-ghan huwa li jinkiseb valur ta' sorbiment li jkun jista' jintuża biex tinbasar partizzjoni taħt varjetà ta' kondizzjonijiet ambjentali; għal dan l-ghan, għal kull prodott kimiku li jiġi meqjus, jiġu ddeterminati l-koeffiċjent ta' adsorbiment għall-ekwilibriju fuq tipi ta' hamrija differenti bħala funzjoni tal-karatteristiċi tal-hamrija stess (e.ż. kontenut karboniku organiku, kontenut ta' tafal u struttura tal-hamrija u pH). Tipi differenti ta' hamrija għandhom jintużaw sabiex ikopru bl-aktar mogħod wiesgħa possibbli l-interazzjonijiet ta' sustanza magħrufa ma' hamrija li tiġri b'mod naturali.

F'dan il-metodu, l-adsorbiment jirrappreżenta l-proċess ta' vinkolazzjoni ta' sustanza kimika mal-wieċ tal-hamrija; ma tidistingwix bejn proċessi differenti ta' adsorbiment (adsorbiment fiżiku u kimiku) u proċessi oħra bħad-degradazzjoni katalitika fil-wieċ, l-adsorbiment bil-massa jew r-reazzjoni kimika. M'għandux jingħata każ ta' l-adsorbiment li jsehh fuq il-partiċelli kolloidali (djametru < 0,2 µm) ġenerati mill-hamrija.

▼B

Il-parametri tal-ħamrija meqjusa l-aktar importanti għall-adsorbiment huma: kontenut karboniku organiku (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) u pH għall-kompost ionizzabbli (3) (4) (42). Parametri oħra tal-ħamrija li jista' jkollhom impatt fuq l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza partikolari huma l-kapaċità effettiva ta' l-iskambju katjoniku (ECEC), il-kontenut ta' ossidi amorphous tal-hadid u tal-aluminjum, partikolarment għal ħamrija vulkanika u tropikali (4), kif ukoll il-wieċ speċifiku (49).

Din il-prova hija magħmula biex tevalwa l-adsorbiment ta' prodotti kimiċi fuq tipi differenti ta' ħamrija differenti b'raġe ta' kontenut karboniku organiku, kontenut ta' tafal u struttura tal-ħamrija, u pH li jvarja. Dan jikkonsisti f'tlett stadji:

Stadju 1: Studju preliminarju sabiex jiġi determinat:

- ir-rapport ħamrija/soluzzjoni,
- il-hin ta' l-ekwilibriju għall-adsorbiment u l-ammont tas-sustanza sperimentali adsorbita fl-ekwilibriju,
- l-adsorbiment tas-sustanza sperimentali fl-uċuh tar-reċipjenti u l-istabilità tas-sustanza sperimentali matul il-perjodu sperimentali.

Stadju 2: Screening prova: l-adsorbiment huwa studjat f'ħames tipi differenti ta' ħamrija permezz ta' kinetika ta' adsorbiment ta' konċentrazzjoni singola u determinazzjoni tal-koeffiċjenti K_d u K_{oc} .

Stadju 3: Determinazzjoni ta' l-izotermini ta' adsorbiment ta' Freundlich biex tiġi stabbilita l-influenza tal-konċentrazzjoni fuq id-daqs ta' l-adsorbiment fuq il-ħamrija.

Studju tad-desorbiment permezz tal-kinetika ta' desorbiment/ta' l-izotermini ta' adsorbiment ta' Freundlich (Anness 1).

1.3.

DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
A_{t_i}	persentaġġ ta' adsorbiment fil-hin t_i	%
A_{eq}	persentaġġ ta' adsorbiment fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fil-hin t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija matul l-intervall ta' hin Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	μg
m_0	massa tas-sustanza sperimentali fil-pipetta, fil-bidu tal-prova ta' l-adsorbiment	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali mkejla f'alikwota (v_a^A) fil-hin t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa tas-sustanza fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	μg
m_{soil}	kwantità tal-faži ħamrija, espressa f'massa ta' ħamrija xotta	g

▼ B

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
C_{st}	konċentrazzjoni ta' massa tas-soluzzjoni ta' riżerva tas-sustanza	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	konċentrazzjoni inizjali tal-massa tas-soluzzjoni sperimentali f'kuntatt mal-hamrija	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-fażi bl-ilma fil-hin t_i , meta issir l-analiżi	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	kontenut tas-sustanza adsorbita fuq il-hamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-fażi bl-ilma fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	volum inizjali tal-fażi bl-ilma f'kuntatt ma' l- ilma matul il-prova ta' adsorbiment	cm^3
v_a^A	volum ta' l-alikwota fejn tiġi mkejla s-sustanza sperimentali	cm^3
K_d	koeffiċjent ta' distribuzzjoni għall-adsorbiment	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
K_{oc}	koeffiċjent ta' adsorbiment normalizzat għall-karbonju organiku	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
K_{om}	koeffiċjent ta' distribuzzjoni normalizzat għas-sustanza organika	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
K_F^{ads}	koeffiċjent ta' adsorbiment skond Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$
$1/n$	esponenti ta' Freundlich	
D_{t_i}	persentaġġ ta' desorbiment fil-hin t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	persentaġġ ta' desorbiment matul l-intervall ta' hin Δt_i	%
K_{des}	koeffiċjenti apparenti ta' desorbiment	$\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
K_F^{des}	koeffiċjenti ta' desorbiment skond Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-hamrija fil-hin t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-hamrija matul l-intervall ta' hin Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	Il-massa tas-sustanza determinata b'mod analitiku fil-fażi akwea f'ekwilibriju ta' <i>desorption</i>	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	Il-massa totali tas-sustanza għat-test li ġie <i>desorbed</i> f'ekwilibriju ta' <i>desorption</i>	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa tas-sustanza li tibqa adsorbita fuq il-hamrija wara l-intervall ta' hin Δt_i	μg
m_{aq}^A	massa tas-sustanza residwa mill-ekwilibriju ta' adsorbiment minhabba sostituzzjoni mhux kompluta tal-volum	μg
$C_s^{des}(eq)$	kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa' adsorbita fuq il-hamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment	$\mu\text{g g}^{-1}$

▼ B

Simbolu	Definizzjonijiet	Unitajiet
$C_{aq}^{des}(eq)$	konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza sperimentali preżenti fil-fażi bl-ilma fl-ekwilibriju tad-desorbiment	$\mu g\ cm^{-3}$
V_T	volum totali tal-fażi bl-ilma b'kuntatt mal-ħamrija matul l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment magħmul bil-metodu serje	cm^3
V_R	volum tas-supernatant mneħhi mil-pipetta wara li jintlaħaq ekwilibriju ta' adsorbiment u mibdul b'l-istess volum tas-soluzzjoni ta' 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volum ta' l-alikwota prelevata għal raġuni analitika mill-ħin (i), matul l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment magħmul bil-metodu serje	cm^3
$V_{ra}i^D$	volum tas-soluzzjoni prelevata mill-pipetta (i) biex titkejjel is-sustanza sperimentali, matul l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment (metodu paralleli)	cm^3
V_r^F	volum tas-soluzzjoni prelevata mill-pipetta biex titkejjel is-sustanza sperimentali, fl-ekwilibriju tad-desorbiment	cm^3
MB	bilanċ tal-massa	%
m_E	massa totali tas-sustanza sperimentali estratta f'zewġ stadji, mill-ħamrija u mill-ħitan tar-reċipjent	μg
V_{rec}	volum tas-supernatant miġbur wara li ntlahaq l-fl-ekwilibriju tad-adsorbiment	cm^3
P_{ow}	koeffiċjent tar-ripartizzjoni octanol/ilma	
pKa	kostanti tad-disoċjazzjoni	
S_w	solubilità fl-ilma	$g\ l^{-1}$

1.4. PRINĊIPJU TAL-METODU SPERIMENTALI

Volumi magħrufa ta' soluzzjonijiet tas-sustanza sperimentali, mhux markata jew radjumarkata, b'konċentrazzjonijiet magħrufa 0,01 M $CaCl_2$ huma miżjuda ma' kampjuni ta' ħamrija ta' piż xott magħruf li kienu ekwilibriati qabel f'0,01 M $CaCl_2$. It-taħlita tiġi mħawwda għal żmien xieraq. Is-sospensjonijiet tal-ħamrija jiġu mbaġħad separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u, jekk ikun mixtieq, filtrazzjoni u tiġi analizzata l-fażi bl-ilma. L-ammont ta' sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija tiġi kkalkolata skond id-differenza bejn l-ammont ta' sustanza sperimentali preżenti fis-soluzzjoni mill-bidu u l-ammont li jibqa fl-aħħar ta' l-esperiment (metodu indirett).

Metodu ieħor biex tiġi determinata l-kwantità adsorbita tas-sustanza sperimentali huwa billi tiġi analizzata direttament il-ħamrija (metodu dirett). Din il-proċedura li teħtieġ estrazzjoni tal-ħamrija f'stadji suċċessivi permezz ta' solvent xieraq, hija rakkomandata f'każijiet fejn id-differenza fil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tas-sustanza ma tistax tiġi determinata preċiżament. Eżempji ta' dawn il-każijiet huma: l-adsorbiment tas-sustanza sperimentali fil-wieċ tar-reċipjenti fejn isir l-esperiment, instabilità tas-sustanza sperimentali matul il-ħin ta' l-esperiment, adsorbiment debboli li jagħti biss lok għal varjazzjonijiet żaġġar ta' konċentrazzjoni fis-soluzzjoni; u adsorbiment qawwi li jwassal għal konċentrazzjonijiet baxxi li ma jistgħux jiġu determinati akkuratament. Jekk tintuża sustanza radjumarkata, l-estrazzjoni tal-ħamrija tista' tiġi evitata permezz ta' analiżi tal-fażi ħamrija permezz tat-teknika tal-kombustjoni u l-ghadd suċċessiv tax-xintillazzjoni fil-fażi likwida. Madankollu, l-ghadd tax-xintillazzjoni fil-fażi likwida huwa metodu ta' teknika mhux speċifiku li ma jagħmilx distinzjoni bejn prodotti proġenituri u dawk ta' trasformazzjoni; għaldaqstant għandu jintuża biss jekk il-prodott kimiku sperimentali jibqa stabbli matul id-dewmien kollu ta' l-istudju.

▼B**1.5. INFORMAZZJONI FUQ IS-SUSTANZA SPERIMENTALI**

Ir-reattivi kimiċi għandhom ikunu ta' livell analitiku. Huwa rakkomandat l-użu ta' sustanzi li ma jkunux immarkati b'komposizzjoni magħrufa u preferibbilment purezza mhux anqas minn 95 % jew ta' sustanzi sperimentali radjumarkati li għandhom komposizzjoni u radjupurezza magħrufa. Fil-każ ta' radjumarkaturi ta' nofs-hajja qasira, għandhom jiġu applikati korrezzjonijiet adegwati.

Qabel ma ssir prova għall-adsorbiment-desorbiment, l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza sperimentali għandha tkun disponibbli:

- (a) solubilità fl-ilma (A.6);
- (b) tensjoni tal-fwar (A.4) u/jew il-Kostanti tal-Liġi ta' Henry;
- (ċ) degradazzjoni antibjotika: idrolisi bħalha funzjoni tal-pH (C.7);
- (d) koeffiċjent tar-ripartizzjoni (A.8);
- (e) bijodegradabilità ta' malajr (C.4) jew trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-hamrija;
- (f) pKa tas-sustanzi ionizzabili;
- (g) fotolizi diretta fl-ilma (i.e. spectrum ta' adsorbiment UV-Vis fl-ilma, rendiment quantum) u fotodegradazzjoni fil-hamrija.

1.6. APPLIKABILITÀ TAL-PROVA

Din il-prova hi applikabbli għas-sustanzi kimiċi għal-liema jista' jiġi applikat metoodu analitiku suffiċjentement akkurat. L-istabbiltà tas-sustanza sperimentali matul il-hin neċessarju biex titwettaq il-prova huwa parametru importanti li jista' jinfluwenza l-affidabilità tar-riżultati, speċjalment meta jiġi applikat il-metodu indirett. Għaldaqstant, huwa neċessarju li din l-istabbiltà tiġi verifikata trami studju preliminari; jekk tiġi osservata trasformazzjoni fil-perjodu ta' hin tal-prova, huwa rakkomandat li l-istudju prinċipali għandu jiġi eżegwit billi jiġu analizzati kemm il-faži hamrija kif ukoll il-faži ta' l-ilma.

Jistgħu jinholqu diffikultajiet meta din il-prova isir għal sustanzi li għandhom solubilità baxxa fl-ilma ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹), kif ukoll għal sustanzi ta' karika elevata, dovut għall-fatt illi l-konċentrazzjoni fil-faži bl-ilma ma tistax tiġi mkejla analitikament b'akuratezza effiċjenti. F'dawn il-każijiet, iridu jittiehdu passi addizzjonali. Il-mod kif wiehed jista' jaffronta dawn il-problemi jista' jinstab fit-taqsima rilevanti ta' dan il-metodu.

Fl-isperimentazzjoni fuq sustanzi li jiżvintaw, għandhom jittiehdu prekawzjonijiet biex telf matul l-istudju jiġi evitat.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.7.1. Apparat u reattivi kimiċi**

Apparat normali tal-laboratorju, speċjalment li ġej:

- (a) Pipetti jew kontenituri biex isir l-esperiment. Huwa importanti li dawn il-pipetti jew kontenituri:
 - joqgħodu direttament fiċ-ċentrifuga sabiex jiġi minimizzat telf fil-manipolazzjoni u trasferiment,
 - jkunu magħmula minn materjal inert, li jimminimizza l-adsorbiment fil-wieċ tas-sustanza sperimentali.

▼B

- (b) Apparat għat-taħwid: overhead shaker jew apparat ekwivalenti; l-apparat għat-taħwid għandu jżomm il-hamrija sospiza matul it-taħwid.
- (c) Ċentrifuga: preferibbilment ta' veloċità għolja, e.ż. forza ċentri-fuga > 3 000 g, temperatur kontrollata, kapaċi tneħhi partiċelli b'djometru akbar minn 0,2 µm minn soluzzjonijiet bl-ilma. Sabiex jiġi evitat telf dovut għal volatilità jew ta' ilma, dawn il-kontenituri għandhom jinżammu mgħottija matul iċ-ċentrifugazzjoni u t-taħwid; biex jiġi minimizzat l-adsorbiment fuq l-ghotjien, dawn iridu jiġu dizattivati pereżempju għotjin mgħottija bit-teflon.
- (d) Fakultattiv: apparat għall-filtrazzjoni; filtri ta' porozità ta' 0,2 µm, sterili, għal użu wiehed. Kura speċjali għandha tingħata għall-ghazla tal-materjal għall-filtrazzjoni sabiex telf eventwali tas-sustanza sperimentali minn dan il-materjal jiġi evitat; għal dawk is-sustanzi li ma jinhallux malajr, mhux opportun li jintuża materjal għall-filtrazzjoni organiku.
- (e) Strumentazzjoni analitika, adatta biex titkejjel il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika sperimentali.
- (f) Forn tal-laboratorju, kapaċi jżomm temperatura ta' 103 °C sa 110 °C.

1.7.2. **Karatterizzazzjoni u selezzjoni tal-hamrija**

Il-hamrija għandha tiġi karatterizzata minn tlett parametri li huma meqjusa maġġorment responsabbli għall-kapaċitaa ta' l-adsorbiment: karbonju organiku, kontenut f'tafal u struttura tal-hamrija, u pH. Kif diġà msemmi (ara Skop) għandhom jiġu meqjusa propjetajiet fiżiko-kimiċi oħra tal-hamrija li jista' jkollhom impatt fuq l-adsorbiment/desorbiment ta' sustanza partikolari.

Il-metodi użati għall-karatterizzazzjoni tal-hamrija huma importanti hafna u jista' jkollhom influwenza sinifikattiva fuq ir-rizultati. Għaldaqstant, huwa rakkomandat illi l-pH tal-hamrija għandha titkejjel f'soluzzjoni ta' 0,01 M CaCl₂ (iġifieri fis-soluzzjoni użata għall-prova ta' l-adsorbiment/desorbiment) skond il-metodu ISO li jikkorrispondi (ISO-10390-1). Huwa rakkomandat ukoll illi jiġu determinati l-popjetajiet rilevanti l-oħra tal-hamrija skond metodi standard (pereżempju ISO 'Manwal ta' l-Analiżi tal-Hamrija'); dan jippermetti illi l-analiżi tad-data fuq is-sorbiment tkun ibbażata fuq parametri tal-hamrija standardizzati globalment. Ir-refernzi (50-52) jagħtu xi indikazzjonijiet fuq il-metodi standard disponibbli għall-analiżi u għall-karatterizzazzjoni tal-hamrija. Għall-kalibrazzjoni tal-metodi sperimentali tal-hamrija, huwa rakkomandat l-użu ta' hamrija ta' referenza.

It-Tabella 1 tagħti indikazzjoni għall-ghazla tal-hamrija għall-esperimenti ta' l-adsorbiment/desorbiment. Is-seba' kwalitajiet ta' hamrija magħżula ikopru l-kwalitajiet li jinstabu f'żoni ġeografici temperati. Meta s-sustanzi sperimentali ikunu ionizzabbli, il-kwalitajiet ta' hamrija magħżula għandhom ikopru range wiesgħa ta' pH, sabiex ikun jista' jiġi evalwat l-adsorbiment tas-sustanza fil-forma ionizzata u dik mhux ionizzata. Indikazzjoni fuq kemm il-kwalità ta' hamrija għandha tintuża fl-istadji varji tal-prova tinstab taħt 1.9. Eżekuzzjoni tal-prova.

Jekk jiġu preferuti kwalitajiet oħra ta' hamrija, għandhom jiġu karatterizzati permezz ta' l-istess parametri u għandu jkollhom varjazzjoni simili fil-propjetajiet għal dawk deskritti f'Tabella 1, anke jekk ma jaqblux eżattament mal-kriterji.



Tabella 1:

Gwida ghas-selezzjoni tal-kampjuni tal-hamrija għall-adsorbiment-desorbiment

Kwalità ta' hamrija	Range ta' pH (f'0,01 M CaCl ₂)	Kontenut f'karbonju organiku (%)	Kontenut f'tafal (%)	Komposizzjoni tal-hamrija (*)
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 – 80	tafal
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 – 40	art taflija
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 – 25	art imtajjna
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 – 30	art tajba u għammiela
5	< 4,0 - 6,0	< 0,5 - 1,5	< 10 – 15	art imrammla
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0	40 – 65	art taflija/tafal
7	< 4,5	> 10	< 10	ramel/art imrammla

(*) Skond il-FAO u s-sistema US (85).

Il-varjabbli rispettivi għandhom juru preferibbilment il-valuri fil-medda mogħtija. Jekk, madankollu, ikun hemm diffikultajiet fis-sejba tal-materjal ta' hamrija xieraq, il-valuri taht il-minimu indikat huma aċċettati.

Il-hamrija b'inqas minn 0,3 % tal-karbonju organiku tista' tfixxkel il-korrelazzjoni bejn il-kontenut organiku u ta' adsorbiment. Għalhekk, huwa rakkomandat l-użu tal-hamrija li fiha kontenut minimu ta' karbonju organiku ta' 0,3 %.

1.7.3. Kollezzjoni u hażna tal-kampjuni tal-hamrija

1.7.3.1. Kollezzjoni

Għall-kampjunaġġ mhumiex rakkomandati tekniċi jew strumenti speċifiċi; it-teknika tal-kampjunaġġ tiddependi fuq il-finalità ta' l-istudju (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Għandu jitqies dan li ġej:

- (a) informazzjoni dettaljata fuq l-istorja ta' l-għalqa minn fejn sar il-kampjunaġġ hija neċessarja; dan jinkludi l-lokalità, il-medda vegetali, trattamenti bl-użu ta' pesticidi u/jew fertilizzanti, zidiet bioloġiċi jew kontaminazzjoni aċċidentali. Rigward id-deskrizzjoni tal-lokalità fejn sar il-kampjunaġġ, għandhom jiġu osservati r-rakkomandazzjonijiet ta' l-standard ta' l-ISO fuq il-kampjunaġġ tal-hamrija (ISO 10381-6);
- (b) il-lokalità fejn sar il-kampjunaġġ trid tiġi definita skond il-metodu UTM (Proġettazzjoni Universali Trażversali Merkatorja/Datum Orizzontali Ewropew) jew permezz tal-koordinati ġeografiċi tiegħu; dan jista' jippermetti rikollizzjoni ta' kwalità ta' hamrija partikolari fil-futur jew jist' jgħin jiddefinixxi l-hamrija taht sistemi varji ta' klassifikazzjoni użati f'pajjiżi differenti. Ukoll, jingabar biss l-orizzont A sa fond massimu ta' 20 ċm. Speċjalment għal-kwalità ta' hamrija n. 7 jekk il-hamrija tagħmel parti minn orizzont O_h, dan irid jiġi miżjud fril-kampjunaġġ.

Il-kampjuni tal-hamrija għandhom jinġarrew permezz ta' kontenituri u taht u f'kondizzjonijiet ta' temperatura li jiggarantixxu li l-propjetajiet oriġinali tal-hamrija ma jiġux mibdula b'mod sinifikattiv.

▼B

1.7.3.2. *Hażna*

L-użu ta' hamrija prelevata reċentement huwa preferibbli. Biss meta dan ma jkunx possibbli l-hamrija tista' tiġi maħżuna f'temperatura ambjentali u għandha tinżamm niexfa bl-arja. Għall-hażna mhux rakkomandat l-ebda limitu ta' hin partikolari, imma hamrija maħżuna għal aktar minn tliet snin għandha tiġi rianalizzata qabel l-użu biex jiġi verifikat il-kontenut karboniku organiku, pH u CEC.

1.7.3.3. *Manipolazzjoni u preparazzjoni tal-kampjuni tal-hamrija għall-prova*

Il-hamrija trid tiġi mnixxa bl-arja f'temperatura ambjentali (preferibbilment bejn 20-25 °C). Is-disgregazzjoni trid tiġi magħmula bl-anqas forza possibbli, sabiex l-istruttura oriġinali tal-hamrija tinbidel mill-anqas possibbli. Il-hamrija trid tintgħarbel sa qies partikolari ≤ 2 mm; skond ir-rakkomandazzjonijiet tan-norma ta' l-ISO fuq il-kampjunagg tal-hamrija (ISO 10381-6). Homogenità akkurata hija rakkomandata, peress li din tkabbar ir-reproċibilità tar-riżultati. Il-kontenut ta' umdità f'kull kwalità ta' hamrija hu determinat fuq tlett aliquoti msahhna sa 105 °C CASemm ma jkun hemm l-ebda tibdil sinifikattiv fil-piż (approssimament 12 s). Għall-kalkoli kollha il-massa tal-hamrija tirreferi għall-massa xxottata fil-forn, i.e. il-piż tal-hamrija kkoreġut għall-kontenut ta' umdità tiegħu.

1.7.4. **Preparazzjoni tas-sustanza sperimentali għall-applikazzjoni għall-hamrija**

Is-sustanza sperimentali tiġi mahlula f'soluzzjoni 0,01 M CaCl_2 f'ilma distillat jew deionizzat; is-soluzzjoni ta' CaCl_2 , użata bħala l-fażi tas-solvent bl-ilma, tiswa biex titjieb iċ-ċentrifugabilità u timminimizza l-iskambjar ta' katjoniku. Il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna preferibbilment għandha tkun tlett ordni ta' kobar għola mil-limitu tas-sejba tal-metodu analitiku użat. Dan il-parametru jissalvagwardja miżuri akkurati fil-każ tal-metodoloġija użata f'dan il-metodu; barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna għandha tkun inferjuri għas-solubilità tas-sustanza sperimentali fl-ilma.

Preferibbilment, is-soluzzjoni maħżuna għandha titlesta' immedjatement qabel il-hin ta' l-applikazzjoni għall-kampjuini tal-hamrija u għandha tinżamm magħluqa fid-dlam f'4 °C. Il-hin tal-hażna jiddependi fuq l-istabbiltà tas-sustanza sperimentali u l-konċentrazzjoni tagħha fis-soluzzjoni.

Sustanzi lijdumu biex jinhallu biss ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹), jista' jkun neċessarju agent xieraq għas-solubilizzazzjoni meta diffiċilment tinhall is-sustanza sperimentali. Dan l-agent għas-solubilizzazzjoni: (a) irid ikun jithallat ma l-ilma bħal methanol jew acetonitrile; (b) il-konċentrazzjoni tiegħu ma tridx taqbeż 1 % tal-volum totali tas-soluzzjoni maħżuna u trid tikkostitwixxi anqas minn dan fis-soluzzjoni tas-sustanza sperimentali li tiġi f'kontatt mal-hamrija (preferibbilment anqas minn 0,1 %); u (ċ) m'għandux ikun surfactant jew jagħti lok għal reazzjonijiet solvolitiċi mas-sustanza kimika sperimentali. L-użu ta' agent solubilizzanti għandu jiġi msemmi u ġustifikat fir-rapurtagg tad-data.

Alternattiva oħra għal sustanzi li jinhallu bil-mod tikkonsisti fiż-zieda intenzjonali tas-sustanza sperimentali mas-sistema sperimentali: is-sustanza sperimentali tiġi mahlula go solvent organiku, u minn dan alikwota tiġi miżjuda mas-sistema tal-hamrija u 0,01 M soluzzjoni ta' CaCl_2 f'ilma distillat jew deionizzat. Il-kontenut tas-solvent organiku fil-fażi bl-ilma għandha tinżamm l-aktar baxxa possibbli, normalment li ma taqbiżx 0,1 %. Iż-zieda intenzjonali ta' soluzzjoni organika tista' tikkomprometti r-riproduċibilità mill-aspett tal-volum. Għaldaqstant, zball addizzjonali jista' jiġi introdott bħala s-sustanza sperimentali u konċentrazzjoni tal-kosolvent ma jkunx l-istess fil-provi kollha.

▼B**1.8. PREREQUIŻITI GHALL-EŻEKUZZJONI TAL-PROVA TA' L-ADSORBIMENT/DESORBIMENT****1.8.1. Metodu analitiku**

Fost il-parametri ewlenin li jistgħu jinfluwenzaw l-akkuratezza tal-miżuri tas-sorbiment hemm il-preċiżjoni tal-metodu analitiku fl-analiżi kemm tal-fażi soluzzjoni, kif ukoll tal-fażi ta' l-adsorbiment, l-istabilità u l-purezza tas-sustanza sperimentali, il-kisba ta' l-ekwilibriju tas-sorbiment, l-ordni tal-kobor tal-varjazzjonijiet ta' konċentrazzjoni tas-soluzzjoni, ir-rapport hamrija/soluzzjoni u il-varjazzjonijiet fl-istruttura tal-hamrija matul il-proċess ta' ekwilibrazzjoni (35) (59-62). Xi eżempji, fokalizzati fuq il-preċiżjoni, jinstgħabu fl-Anness 2.

L-attendibilità tal-metodu analitiku li jintuża trid tiġi kontrollata fir-range ta' konċentrazzjoni li x'aktarx isehh matul il-prova. Min jagħmel l-esperiment għandu jhossu hieles li jiżviluppa metodu xieraq b'akkuratezza, preċiżjoni, riproducibilità, limiti ta' rivelazzjoni u ġbir xierq. Gwida għall-eżekuzzjoni tal-prova hija mogħtija fl-esperiment li ġej.

Volum xieraq ta' 0,01 M CaCl_2 , e.ż. 100 cm^3 , jithawwad għal 4 s bil-piż ta' hamrija, e.ż. 20 g, li għandha adsorbiment għoli, i.e. b'kontenut għoli ta' karbonju organiku u ta' tafal; dawn il-piżijiet u volumi jistgħu ivarjaw skond bżonnijiet analitiċi, imma rapport hamrija/soluzzjoni ta' 1:5 jista' jirrappreżenta punt ta' bidu konvenjenti. It-tahlita tiġi ċentrifugata u l-fażi bl-ilma tista' tiġi filtrata. Ma' din ta' l-aħħar jiġi miżjud volum determinat ta' soluzzjoni maħżuna tas-sustanza sperimentali sabiex kiseb konċentrazzjoni nominali fil-kamp tar-range ta' konċentrazzjoni li x'aktarx isehh matul il-prova. Dan il-volum m'għandux jaqbeż 10 % tal-volum finali tal-fażi bl-ilma, sabiex in-natura tas-soluzzjoni ta' preekwilibrazzjoni tinbidel mill-anqas possibbli. Is-soluzzjoni tiġi analizzata.

Sabiex jitqiesu s-sustanzi artifiċjali użati fil-mod analitiku u l-effetti martici kkawżati mill-hamrija irid jiġi inkluz "blank run" li jikkonsisti f'sistema ta' hamrija + soluzzjoni ta' CaCl_2 (mingħajr iż-żieda tas-sustanza sperimentali).

Għall-miżuri ta' sorbiment jistgħu jintużaw metodi analitiċi, fosthom kromatografija gass-likwidu (GLC), kromatografija likwida ta' pres-tazzjoni għolja (HPLC), spettrometrija (e.ż. GC/spettrometrija tal-massa, HPLC/spettrometrija tal-massa) u kont tax-xintillazzjonijiet likwidi (għall-sustanzi radjumarkati). Indipendentement mill-metodu analitiku użat, huwa meqjus adegwat jekk il-ġbir ikun bejn 90 % u 110 % tal-valur nominali. Sabiex tithalla l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni wara li ssir r-ripartizzjoni, il-limiti tar-rivelazzjoni tal-metodu analitiku trid tkun ta' l-anqas żewġ ordnijiet ta' kobor anqas mill-konċentrazzjoni nominali.

Il-karatteristiċi u limiti ta' rivelazzjoni tal-metodu analitiku utilizzat biex isiru l-istudji fuq l-adsorbiment huma importanti biex jiġu definiti il-kondizzjonijiet sperimentali u l-eżekuzzjoni shiha tal-prova. Dan il-metodu jsegwi skema sperimentali ġenerali u jipprovdi rakkomandazzjonijiet u linji gwida għal soluzzjonijiet alternattivi fejn il-metodu analitiku u l-faċilitajiet tal-laboratorju jimponi limitazzjonijiet.

▼B

1.8.2. **Għażla tar-rapporti ottimali ħamrija/soluzzjoni**

Fl-istudji tal-fenomeni fuq is-sorbiment, l-għażla tar-rapporti ħamrija/soluzzjoni tiddependi mill-koeffiċjent tad-distribuzzjoni K_d u mill-grad relattiv ta' adsorbiment mixtieq. Il-varjazzjoni tal-konċentrazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjoni tiddetermina l-preċiżjoni statistika tal-miżura li tiddependi mill-forma ta' l-ekwazzjoni ta' l-adsorbiment u, fil-każ ta' l-iskoperta tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimikafis-soluzzjoni, tal-limitazzjoni tal-metodoloġija analitika applikata. Għaldaqstant, fil-prattika ġenerali, ikun utli li jiġu adottati numru limitat ta' rapporti fissi, fejn il-perċentwali ta' adsorbiment tkun aktar minn 20 %, u preferibbilment > 50 % (62), fl-istess hin kura trid tingħata sabiex il-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fil-fażi bl-ilma tkun dejjem għolja biżżejjed li tiġi mkejla bi preċiżjoni. Dan huwa partikolarment importanti meta il-perċentwali ta' adsorbiment ikunu għolja.

Approċċ konvenjenti biex jintgħażlu r-rapporti ħamrija/ilma xierqa, jibbaza fuq stima tal-valur K_d permezz ta' studji preliminari jew permezz ta' metodi ta' teknika ta' valutazzjoni stabbiliti (Anness 3). Ir-rapport xieraq jista' mbagħad jintgħażel fuq il-bażi ta' grafika tar-rapport ħamrija/soluzzjoni versus K_d għal persentaġġi fissi ta' adsorbiment (Fig. 1). Tali grafika hija bbażata fuq il-preżuppost li l-ekwazzjoni ta' l-adsorbiment hija lineari ⁽¹⁾. Ir-ralazzjoni applikabbli tinkiseb billi titranga l-ekwazzjoni (4) tal- K_d fil-forma ta' ekwazzjoni

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

jew fil-forma logaritmika tagħha, billi tassumi li $R = m_{\text{soil}}/V_0$ and

$$A_{\text{eq}} \% / 100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0};$$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{A_{\text{eq}} \% / 100}{1 - A_{\text{eq}} \% / 100} \right] \quad (2)$$

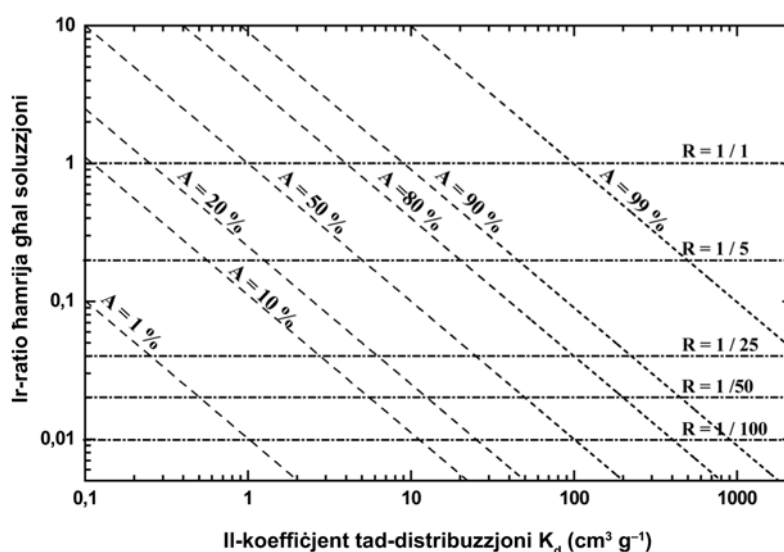


Fig. 1. Relazzjoni bejn il-valur ta' K_d u r-rapporti varji ħamrija/soluzzjoni fil-perċentwali varji tas-sustanza sperimentali adsorbita

⁽¹⁾ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

▼B

Fig. 1 turi rapporti hamrija/soluzzjoni mehtieġa bhalha funzjoni K_d għal-livelli differenti ta' adsorbiment. Pe reżempju, għal rapport hamrija/soluzzjoni ta' 1:5 u K_d ta' 20, l-adsorbiment għandu jkun ta' madwar 80 %. Biex jinkiseb 50 % adsorbiment għall-istess ammont ta' K_d , irid jintuża rapport ta' 1:25. Dan l-approċċ, biex jintagħzlu rapporti xierqa hamrija/soluzzjoni, joffri lill-investigatur il-flessibilità neċessarja biex ilahhaq ma' l-eżiġenzi sperimentali.

L-akbar diffikultajiet huma dawk fejn is-sustanza kimika tiġi adsorbita b'doża għolja hafna jew baxxa hafna. Meta jkun hemm adsorbiment baxx, hu rakkomandabbli l-użu ta' rapport hamrija/soluzzjoni ta' 1:1, għalkemm għal xi tipi ta' hamrija ta' kontenut organiku għoli jistgħu jkunu neċessarji miżuri iżar sabiex tinkiseb tahlita likwida. Fil-metodoloġija analitika kura trid tinghata biex jitkejjlu bidliet zgħar fil-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni; inkella l-kejl ta' l-adsorbiment ma jkunx preċiż. Minn naħa l-oħra, għal valuri għolja hafna ta' K_d , tista' tasal għal rapporti hamrija/soluzzjoni ta' 1:100 biex thalli fis-soluzzjoni kwantità sinifikattiva ta' sustanza kimika. Madankollu, kura trid tinghata sabiex tahlit sew jiġi żgurat, hin adegwat irid jithalla biex is-sistema tilhaq ekwilibriju. Biex issolvi dawn il-każijiet estremi meta metodoloġija analitika tkun nieqsa, possibiltà oħra hija dik li tipprevedi l-valur ta' K_d bl-użu ta' tekniki ta' valutazzjoni bbażati, pereżempju, fuq valuri P_{ow} (Anness 3). Dan jista' jkun utli speċjalment għal sustanzi kimiċi li għandhom adsorbiment baxx/popolari b' $P_{ow} < 20$ u għal dawk lipofili/altament sorbitivi b' $P_{ow} > 10^4$.

1.9. EŻEKUZZJONI TAL-PROVA

1.9.1. Il-kondizzjonijiet tal-prova

L-esperimenti kollha iridu jsiru f'temperatura ambjentali u, jekk possibbli, f'temperatura kostanti bejn 20 °C u 25 °C.

Il-kondizzjonijiet għaċċ-centrifugazzjoni iridu jippermettu t-tnehhija ta' particeċli akbar minn 0,2 µm mis-soluzzjoni. Dan il-valur huwa l-iżar particeċla li hija kkunsidrata particeċla solida, u jirrappreżenta l-limitu bejn particeċli solidi u kolloidali. Gwida biex jiġu stabbiliti l-kondizzjonijiet taċċ-centrifugazzjoni hija mogħtija fl-Anness 4.

Jekk il-facilitajiet taċċ-centrifugazzjoni ma jkunux jistgħu jiggarran-tixxu t-tnehhija ta' particeċli akbar minn 0,2 µm, kombinazzjoni ta' centrifugazzjoni u filtrazzjoni b'filtri 0,2 µm tista' tintuża. Dawn il-filtri għandhom ikunu magħmula minn materjal inert xieraq biex jinevita telf tas-sustanza sperimentali fuqhom. F'kull każ, għandu jiġi ppruvat li ma jkun hemm l-ebda telf tas-sustanza sperimentali matul il-filtrazzjoni.

1.9.2. Stadju 1 – Studju preliminarju

L-iskop ta' studju preliminarju diġà ngħata fis-sezzjoni Skop. Gwida biex issir tali prova hija mogħtija fl-esperiment sugġerit hawn taht.

1.9.2.1. *Selezzjoni tar-rapporti ottimali hamrija/soluzzjoni*

Jintużaw żewġ tipi ta' hamrija u tlett rapporti hamrija/soluzzjoni (sitt esperimenti). Tip ta' hamrija għandha kontenut għoli ta' karbonju organiku u kontenut baxx ta' tafal, u l-oħra għandha kontenut baxx ta' karbonju organiku u kontenut għoli ta' tafal. Ir-rapporti hamrija/soluzzjoni huma sugġeriti:

— 50 g hamrija u 50 cm³ soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/1),

▼B

- 10 g hamrija 50 cm^3 soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/5),
- 2 g hamrija u 50 cm^3 soluzzjoni bl-ilma tas-sustanza sperimentali (rapport 1/25).

L-ammont minimu ta' hamrija li ghandha tintuża tiddependi mill-faċilitajiet tal-laboratorju u l-eżekuzzjoni tal-metodi analitiċi użati. Madankollu, biex jinkisbu riżultati affidabbli mill-prova, hu rakkomandat illi tintuża mill-anqas 1 g, u preferibbilment 2 g.

Sabiex tiġi verifikata l-istabbiltà tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni ta' CaCl_2 u l-adsorbiment eventwali fuq il-hitant tal-kontenituri, irid jitlestha' kampjun ta' riferiment li ma jkunx fiha hamrija imma jkun fiha biss is-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni ta' 0,01 M CaCl_2 li jiġi sottopost eżattament għall-istess passi tas-sistemi sperimentali.

Għal kull hamrija jiġi preparat “blank run” bl-istess ammont ta' hamrija u volum totali ta' soluzzjoni 50 cm^3 0,01 M CaCl_2 (mingħajr prova sperimentali) li tiġi sottoposta għall-istess proċedura sperimentali. Dan iservi bħala kontroll bażiku matul l-analiżi biex jiġu skoperti sustanzi li jinterfeixxu jew hamrija kontaminata.

L-esperimenti kollha, inkluzi kontrolli u “blanks”, għandhom isiru minn l-anqas darbtejn. In-numru totali ta' kampjuni li għandhom jitlestew għall-istudju għandhom jiġu kalkolati skond il-metodoloġija li tiġi segwita.

Metodi għall-istudju preliminarju u l-istudju ewlieni huma ġeneralment l-istess, eżċezzjonijiet imsemmija fejn rilevanti.

Il-kampjuni tal-hamrija mniexfin bl-arja jiġu ekwilibriati billi jithawdu għal (12 s) lejl shih qabel jum l-esperiment, b'volum minimu ta' 45 cm^3 ta' 0,01 M CaCl_2 . Wara jiżdied ċertu volum tas-soluzzjoni riżerva tas-sustanza sperimentali sa total ta' 50 cm^3 . Il-volum tas-soluzzjoni riżerva miżjud: (a) m'għandux ikun aktar minn 10 % tal-volum finali 50 cm^3 tal-fażi bl-ilma sabiex issir l-anqas bidla possibbli lin-natura tas-soluzzjoni pre-ekwibrata; u (b) għandu jirriżulta, preferibbilment, f'koncentrazzjoni inizjali tas-sustanza sperimentali f'kuntatt mal-hamrija (C_0) akbar b'żewġ ordnijiet ta' preferenza mill-anqas, ta' l-iskoperta tal-metodu analitiku, sabiex tiġi salvagwardjata l-kapaċità biex isiru mizuri eżatti ankè meta l-adsorbiment ikun qawwi (> 90 %) u biex wara jiġu stabbiliti l-izotermi ta' l-adsorbiment. Hu rakkomandat ukoll, jekk possibbli, illi l-koncentrazzjoni inizjali tas-sustanza (C_0) ma taqbiżx in-nofs tal-limitu tas-solubilità tagħha.

L-eżempju li jmiss juri l-mod kif tikkalkula l-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni riżerva (C_{st}). Tibda bil-hsieb illi l-limitu ta' rivelazzjoni huwa 0,01 $\mu\text{g cm}^{-3}$ u l-adsorbiment huwa ta' 90 %; għaldaqstant, il-koncentrazzjoni inizjali tas-sustanza sperimentali f'kuntatt mal-hamrija trid tkun, preferibbilment, 1 $\mu\text{g cm}^{-3}$ (żewġ ordnijiet ta' kobor għola mil-limitu ta' rivelazzjoni). Jekk jiżdied il-massimu rakkomandat tal-volum tas-soluzzjoni maħżuna, i.e. 5 sa 45 cm^3 tas-soluzzjoni ta' ekwibrazzjoni ta' CaCl_2 0,01 M (= 10 % tas-soluzzjoni maħżuna għal volum totali ta' 50 cm^3 tal-fażi bl-ilma), il-koncentrazzjoni tas-soluzzjoni maħżuna għandha tkun ta' 10 $\mu\text{g cm}^{-3}$; jiġifieri oghla bi tliet ordnijiet ta' kobor mil-limitu ta' rivelazzjoni tal-metodu analitiku.

Il-pH tal-fażi bl-ilma għandu jitkejjel qabel u wara kuntatt mal-hamrija peress li għandu rwol importanti fil-proċess kollu ta' l-adsorbiment, speċjalment għal sustanzi ionizzabbli.

▼B

It-tahlita tithawwad CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment. Il-hin ta' l-ewilibriju fil-hamrija huwa varjabbli hafna, skond is-sustanza kimika fil-hamrija; perjodu ta' 24 s huwa biżżejjed normalment (77). Fl-istudju preliminari, kampjuni jistgħu jingabru b'sekwenza matul perjodu ta' tahlit ta' 48 s (pereżempju f'4, 8, 24, 48 s). Madankollu, il-hinijiet ta' l-analizi iridu jiġu meqjusa bi flessibilità skond l-iskeda ta' xogħol tal-laboratorju.

Hemm żewġ alternattivi għall-analizi tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni bl-ilma: (a) il-metodu paralleli (b) il-metodu f'serje. Għandu jingħad illi, għalkemm il-metodu paralleli huwa aktar tedjanti fil-kamp sperimentali, it-trattament matematiku tas-soluzzjonijiet huwa aktar sempliċi (Anness 5). Madankollu, l-għażla tal-metodoloġija li għandha tintuża, hija f'idejn il-persuna li tagħmel l-esperiment li tkun trid tqis il-faċilitajiet tal-laboratorju u r-riżorsi li huma disponibbli.

(a) Metodu paralleli: kampjuni bl-istess relazzjoni hamrija/soluzzjoni humw ppreparati, bl-istess numru ta' intervalli ta' ħin li hu mixtieq biex isir l-istudju tal-kinetika ta' l-adsorbiment. Wara ċentrifugazzjoni u, jekk mixtieq, filtrazzjoni, il-fażi bl-ilma ta' l-ewwel pipetta tiġi miġbura bl-aktar mod komplet possibbli u titkejjel wara, pereżempju, 4 s, dik tat-tieni pipetta wara 8 s, dik tat-tielet wara 24, eċċ.

(b) Metodu f'serje: għal kull rapport hamrija/soluzzjoni jiġi preparat biss kampjun doppju wieħed. f'intervalli determinati ta' ħin it-tahlita tiġi ċentrifugata biex il-fażijiet jiġu separati. Alikwota żgħira ta' riżorsi tiġi immedjatament analizzata għas-sustanza sperimentali; imbagħad l-esperiment ikompli bit-tahlita originali. Jekk l-filtrazzjoni tiġi applikata wara ċ-ċentrifugazzjoni, il-laboratorju għandu jkollu faċilitajiet biex issir l-filtrazzjoni ta' aliquoti bl-ilma żgħar. Huwa rakkomandabbli li l-volum totali ta' l-aliquoti meħuda, ma jkunx aktar minn 1 % tal-volum totali tas-soluzzjoni, sabiex ir-rapport hamrija/soluzzjoni ma jimbiddelx b'mod sinifikattiv u biex titnaqqas il-massa tas-solute disponibbli għall-adsorbiment matul il-prova.

Il-perċentwali ta' l-adsorbiment A_t huwa kkalkolat f'kull punt ta' ħin (t) fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni inizjali nominali u l-konċentrazzjoni mkejla fil-hin tal-kampjunaġġ (t_i), korrett għall-hin tal-“blank”. Plots ta' l- A_t versus l- t (Fig. 1 Anness 5) huma magħmula sabiex jiġi vvalutat jekk inkisbitx il-pjattaforma ta' l-ekwilibriju⁽¹⁾. Il-valur K_d fl-ekwilibriju jiġi kkalkolat ukoll. Ibbażat fuq dan il-valur K_d , u bl-użu tal-Fig.1 jintagħżlu rapporti xierqa hamrija/soluzzjoni, sabiex il-perċentwali ta' l-adsorbiment taqbeż 20 % u preferibbilment > 50 % (61). L-ekwazzjonijiet u l-prinċipji tal-plotting kollha applikabbli huma mgħotija fit-taqsimha fuq id-Data u rapurtaġġ u fl-Anness 5.

1.9.2.2. *Determinazzjoni tal-ħin ta' ekwilibrazzjoni ta' l-adsorbiment u ta' l-ammont sustanza sperimentali adsorbita fl-ekwilibriju*

Kif diġà msemmi, plots ta' A_t jew C_{aq}^{ads} versus il-ħin jippermettu stima tat-twertieq ta' l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment u l-ammont ta' sustanza sperimentali adsorbita fl-ekwilibriju. Il-figuri 1 u 2 fl-Anness 5 juru eżempji ta' tali plots. Il-ħin ta' l-ekwilibriju huwa dak neċessarju biex is-sistema tilhaq pjattaforma.

⁽¹⁾ Plots tal-konċentrazzjoni tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea C_{aq}^{ads} versus il-ħin jistgħu jintużaw ukoll għall-kalkolu tal-kisba tal-plateau ta' l-ekwilibriju (ara Fig. 2 fl-Anness 5).

▼B

Jekk, b'hamrija partikolari, ma tintlaħaqx pjattaforma iżda issir zieda kontinwa, din tista' tkun dovuta għal fatturi ta' komplikazzjoni bħal biodegradazzjoni jew diffużjoni bil-mod. Biodegradazzjoni tista' tintwera' billi jirrepeti l-esperiment b'kampjun sterilizzat tal-hamrija. Jekk anke f'dan il-każ ma tintlaħaq l-ebda pjattaforma, min qed jagħmel l-esperiment għandu jfittex fenomeni oħra li jistgħu ikunu involuti fl-istudji speċifiċi tiegħu; dan jista' jsir b'modifikazzjonijiet xierqa tal-kondizzjonijiet ta' l-esperiment (temperatura, hin tat-taħwid, rapporti hamrija/soluzzjoni). Ukoll, min qed jagħmel l-esperiment irid jiddeċidi jekk ikomplix il-proċedura sperimentali malgrad ta' eventwali possibbiltà li jintlaħaq ekwilibriju.

1.9.2.3. *L-adsorbiment fil-wiċċ tal-kontenituri u l-istabilità tas-sustanza sperimentali*

Xi informazzjoni fuq l-istabilità tas-sustanza sperimentali u l-adsorbiment tagħha fil-wiċċ tal-kontenituri tagħha tista' tinkiseb billi ssir analiżi tal-kampjuni tal-kontroll. Jekk tiġi osservata deplezzjoni akbar minn l-iżball standard tal-metodu analitiku, tista' tkun kawżata minn degradazzjoni abiotika u/jew adsorbiment fil-wiċċ tal-kontenitur sperimentali. Distinzjoni bejn dawn iż-żewġ fenomeni tista' tintlaħaq billi jinhaslu sew il-hitna tal-kontenitur b'volum magħruf ta' solvent xieraq u billi jiġi analizzat il-likwidu tal-hasil għas-sustanza sperimentali. Jekk l-ebda adsorbiment ma jinstab fil-wiċċ tal-kontenituri sperimentali, il-fasda turi instabilità abiotika tas-sustanza sperimentali. Jekk jinstab adsorbiment, bdil tal-materjal tal-kontenituri sperimentali ikun neċessarju. Madankollu, data fuq l-adsorbiment tal-wiċċ tal-kontenituri sperimentali miġbura minn dan l-esperiment ma tistax tiġi estrapolata direttament lill-esperiment hamrija/soluzzjoni. Il-preżenza ta' hamrija taffetwa l-adsorbiment.

Informazzjoni addizzjonali fuq l-istabilità tas-sustanza sperimentali tista' tinkiseb billi jiġi stabbilit bilanċ tal-massa proġenitriċi fiż-żmien. Dan ifisser illi l-fażi bl-ilma, estratti ta' hamrija u hitna ta' kontenituri sperimentali jiġu analizzati għas-sustanza sperimentali. Id-differenza bejn il-massa ta' kimika sperimentali miżjuda u s-somma tal-massa kimiċi sperimentali fil-fażi bl-ilma, fl-estratti tal-hamrija u fil-hitna ta' kontenituri sperimentali huwa uguali għal massa degradata u/jew volatilizzata u/jew mhux estratta. Sabiex issir determinazzjoni tal-bilanċ tal-massa, l-ekwilibriju ta' adsorbiment trid tintlaħaq matul l-perjodu ta' l-esperiment.

Il-bilanċ tal-massa jrid isir kemm fuq hamrija kif ukoll fuq rapport hamrija/soluzzjoni għal kull tip ta' hamrija li fl-ekwilibriju tagħti lok għal fasda għola minn 20 % u preferibbilment > 50 %. Meta l-esperiment għar-riċerka tar-rapporti jintemm bl-analiżi ta' l-aħħar kampjun tal-ħażi bl-ilma wara 48 s, il-fażijiet iridu jiġu separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u, jekk mixtieqa, filtrazzjoni. Il-fażi bl-ilma trid tingħabar fl-akbar kwantità possibbli, biż-żieda ta' solvent ta' estrazzjoni adatt (koeffiċjent ta' estradizzjoni mhux anqas minn 95 %) mal-hamrija biex tiġi estratta s-sustanza sperimentali. Minn l-anqas żewġ estrazzjonijiet suċċessivi huma rakkomandati. L-ammont ta' sustanza sperimentali estratt mill-hamrija u mill-kontenitur jiġi determinat u l-bilanċ tal-massa jiġi kkalkolat (ekwazzjoni 10, data u rapurtaġġ). Jekk ikun anqas minn 90 %, is-sustanza sperimentali hija meqjusa instabbli fil-perjodu ta' hin ta' l-esperiment. Madankollu, studji xorta jistgħu jtkomplew, għalkemm l-instabilità tas-sustanza sperimentali trid tiġi meqjusa; f'dan il-każ huwa rakkomandat biex jiġu analizzati ż-żewġ fażijiet fl-istudju prinċipali.

▼B

1.9.2.4 *Stadju 2 – Kinetika ta' l-adsorbiment għal konċentrazzjoni ta' sustanza sperimentali*

Jintużaw hames kwalitajiet ta' hamrija, selezzjonati minn Tabella 1. Jekk dan ikun xieraq, huwa vantaġġu jekk tintuża kull kwalità ta' hamrija użata fl-istudju preliminari fost dawn il-hames kwalitajiet ta' hamrija. F'dan il-każ, Stadju 2 m'għandux jerġa' jiġi repetut għall-kwalitajiet ta' hamrija użati fl-istudju preliminarju.

Il-hin ta' l-ekwilibriju, ir-rapport hamrija/soluzzjoni, il-piż tal-kampjun tal-hamrija, il-volum tal-fażi bl-ilma f'kuntatt mal-hamrija u il-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni huma magħżula fuq il-bażi tar-riżultati ta' l-istudji preliminari. L-analizi trid issir, bejn wiehied u iehor, 2, 4, 6, 8 (possibbilment ankè 10) u 24 s wara l-hin tal-kuntatt; il-hin tat-taħwid jista' jiġi estiż sa massimu ta' 48 s fil-każ illi sustanza kimika tirrikjedi hin itwal biex jintlahaq l-ekwilibriju fil-każ tar-riżultati tar-riċerka fil-qasam tar-rapporti. Madankollu, il-hinijiet ta' l-analizi jridu jiġu kkunsidrati b'flessibilità.

Kull esperiment (hamrija waħda u soluzzjoni waħda) isir doppju mill-inqas biex tkun tista' tiġi vvalutata l-varjanza fir-riżultati. F'kull esperiment isir wiehied "blank". Dan jikkonsisti fil-hamrija u fis-soluzzjoni ta' $\text{CaCl}_2 0,01 \text{ M}$, mingħajr iż-żieda ta' sustanza sperimentali, ta' piż u volum, rispettivament, identiku għal dak ta' l-esperiment. Sabiex ikun hemm salvagwardja għall-imprevvisti, kampjun ta' kontroll bis-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni ta' $\text{CaCl}_2 0,01 \text{ M}$ biss (mingħajr hamrija) jiġi soġġett għall-istess proċedura sperimentali.

Il-persentaġġ ta' adsorbiment jiġi kkalkolat f'kull punt ta' hin A_t u/jew intervall ta' hin $A_{\Delta t}$ (skond il-bżonn) impingji kontra l-hin. Jiġu ukoll ikkalkolati l-koeffiċjent ta' distribuzzjoni K_d at equilibrium, u l-koeffiċjent ta' adsorbiment normalizzat tal-karbonju organiku K_{oc} (għall-komposti kimiċi organiċi mhux polari).

Riżultati tal-provi fuq il-kinetika ta' l-adsorbiment

Il-valur linjari K_d hu generalment preċiż biżżejjed biex tkun jista' tiġi deskritta l-imġieba relattiva għas-sorbiment fil-hamrija (35) (78) u jirrappreżenta espressjoni tal-mobilità intrinsika tal-prodotti kimiċi fil-hamrija. Pereżempju, generalment, kimiċi b' $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ huma meqjusa kwalitativament mobbli. Simili hija l-iskema ta' klassifikazzjoni tal-mobilità bbażata fuq valuri K_{oc} żviluppata minn MacCall *et al.* (16). Addizzjonalment, jeżistu skemi ta' klassifikazzjoni ta' filtrazzjoni li huma bbażati fuq ir-relazzjoni bejn K_{oc} u DT-50 ⁽¹⁾ (32) (79).

Ukoll, skond studji fuq l-analizi ta' l-iżbalji (61), valuri K_d anqas minn $0,03 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ma jistgħux jiġu vvalutati akkuratament minn tnaqqis fil-konċentrazzjoni fil-fażi bl-ilma, ankè meta jintuża l-aktar rapport hamrija/soluzzjoni favorevoli (mil-lat tal-preċiżjoni), i.e. 1:1. F'dan il-każ l-analizi taż-żewġ fażijiet, hamrija u soluzzjoni, hija rakkomandata.

⁽¹⁾ DT-50: il-hin tad-degradazzjoni għal 50 % tas-sustanza għat-test.

▼B

Rigward l-osservazzjonijiet magħmula 'l fuq, huwa rakkomandat illi jitkompla l-istudju ta' l-imġieba ta' l-adsorbiment ta' prodott kimiku fil-hamrija u l-mobilità potenzali tiegħu billi jiġu stabbiliti l-izotermi ta' adsorbiment skond Freundlich għal dawn is-sistemi, għal liema, id-determinazzjoni ta' K_d hija possibbli bil-protokoll sperimentali segwit f'dan il-metodu sperimentali. Determinazzjoni akkurata tkun possibbli jekk il-valur li jirriżulta billi ssir multiplikazzjoni tal- K_d mar-relazzjoni hamrija/soluzzjoni ikun $> 0,3$, meta l-miżuri jkunu bbażati fuq tnaqqis fil-konċentrazzjoni fil-fażi bl-ilma (metodu indirett), jew $> 0,1$, meta ż-żewġ fażijiet jiġu analizzati (metodu dirett) (61).

1.9.2.5. *Stadju 3 – Izotermi ta' adsorbiment u kinetika ta' desorbiment/izotermi ta' desorbiment*

1.9.2.5.1. *Izotermi ta' adsorbiment*

Jintużaw hames konċentrazzjonijiet tas-sustanza, li jkopru żewġ ordnijiet ta' kobor; fl-ghazla ta' dawn il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu meqjusa s-solubilità fl-ilma u l-konċentrazzjoni fl-ekwilibriju bl-ilma li jirriżulta. L-istess relazzjoni hamrija/soluzzjoni għal kull kwalità ta' hamrija għandha tinzamm għat-tul kollu ta' l-istudju. Il-prova ta' l-adsorbiment hija magħmula kif deskritt 'il fuq, bl-uniku differenza illi l-fażi bl-ilma tiġi analizzata darba biss fil-hin neċessarju biex jintlaħaq l-ekwilibriju kif determinat qabel fl-Istadju 2. Il-konċentrazzjonijiet ta' l-ekwilibriju fis-soluzzjoni jiġu determinati u l-ammont adsorbit jiġi kkalkolat mill-fasda tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni jew bil-metodu indirett. Il-massa adsorbita għall-unità tal-massa tal-hamrija tiġi mpingħija grafikament bħala funzjoni tal-konċentrazzjoni fl-ekwilibriju tas-sustanza sperimentali (ara Data u rapurtagg).

Riżultati ta' l-esperiment għall-izotermi ta' l-adsorbiment

Fost il-mudelli matematiċi ta' l-adsorbiment proposti s'issa, l-izoterma Freundlich hija dik li tintuża l-iktar biex tiddekrivi l-proċess ta' l-adsorbiment. Informazzjoni aktar dettaljata fuq l-interpretazzjoni u l-importanza tal-mudelli ta' l-adsorbiment hija previst fir-referenzi (41) (45) (80) (81) (82).

Nota: Għandu jiġi osserva illi, għal sustanzi varji, konfront bejn il-valuri ta' K_F (koeffiċjent ta' l-adsorbiment ta' Freundlich) hu possibbli biss jekk dawn il-valuri K_F huma espressi fl-istess unità (83).

1.9.2.5.2. *Kinetika tad-desorbiment*

L-ghan ta' dan l-esperiment huwa illi jiġi nvestigat jekk sustanza kimika tiġix adsorbita reversibilment jew irriversibilment mill-hamrija. Din l-informazzjoni hija mportanti, peress illi l-proċess ta' desorbiment għandu ukoll rwol importanti fl-imġieba ta' sustanza kimika f'hamrija ta' l-ghalqa. Madankollu, id-data tad-desorbiment tikkontribwixxi utiliment għall-mudellar kompjuterizzat tal-filtrazzjoni u għas-simulazzjoni tas-sustanza li tddewweb. Jekk studju ta' desorbiment ikun mixtieq, huwa rakkomandat li l-istudju rakkomandat hawn taht isir fuq kull sistema fejn determinazzjoni akkurata ta' K_d fil-esperiment tal-kinetika ta' l-adsorbiment preċedenti tkun possibbli.

B'mod analogu ma' l-istudju tal-kinetika ta' l-adsorbiment, biex tiġi studjata l-kinetika tad-desorbiment hemm żewġ metodi: (a) il-metodu paralleli u (b) il-metodu f'serje. L-ghazla tal-metodoloġija li għandha tapplika tithalla f'idejn min ikun qed jagħmel l-esperiment li jkun irid jikkonsidra il-faċilitajiet disponibbli u r-riżorsi tal-laboratorju.

▼B

- (a) Metodu paralleli: għal kull hamrija magħżula għall-istudju fuq id-desorbiment, jitlestew kampjuni bl-istess relazzjoni hamrija/-soluzzjoni, daqs kemm hemm intervalli ta' hin li fihom tixtieq tiġi studjata l-kinetika tad-desorbiment. Preferibilmint, jiġu applikati l-istess intervalli ta' hin utilizzati għall-kinetika ta' l-adsorbiment; madankollu, il-hin totali jista' jiġi estiż skond in-neċessità sabiex is-sistema tkun tista' tilhaq l-ekwilibriju ta' desorbiment. F'kull esperiment (hamrija waħda, soluzzjoni waħda) isir wiehied "blank". Dan jikkonsisti fil-hamrija u fis-soluzzjoni 0,01 M ta' CaCl_2 , mingħajr is-sustanza sperimentali, u ta' piz u valur, rispettivament, identiku għal dawk ta' l-esperiment. Bħala kampjun ta' kontroll, is-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni 0,01 M ta' CaCl_2 (mingħajr hamrija) hija soġġetta għall-istess proċedura sperimentali. It-tahlit kollu tas-soluzzjoni mal-hamrija jithawwad sakemm jintlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (kif determinat qabel fl-Istadju 2). Imbagħad, il-fażijiet jiġu separati permezz ta' ċentrifugazzjoni u l-fażijiet bl-ilma, kemm ikun possibbli, jitnehew. Il-volum ta' soluzzjoni mnehhi jiġi sostitwit b'volum ugwali ta' 0,01 M CaCl_2 mingħajr is-sustanza sperimentali u t-tahlit il-ġdid jiġi mhawwad mill-ġdid. Il-fażi bl-ilma ta' l-ewwel pipetta tiġi miġbura bl-aktar mod komplet possibbli u tiġi mkejla, pereżempju, wara 2 s, dik tat-tieni pipetta wara 4 s, dik tat-tielet wara 6 s, eċċ. CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment.
- (b) Metodu f'serje: wara l-esperiment tal-kinetika ta' l-adsorbiment, it-tahlita tiġi ċentrifugata u l-fażi bl-ilmam, sakemm ikun possibbli, titnehha. Il-volum tas-soluzzjoni li jitnehha jiġi sostitwit b'volum ugwali ta' CaCl_2 0,01 M, mingħajr is-sustanza sperimentali. It-tahlita l-ġdida tiġi mhawwda CASemm jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment. Matul dan il-perjodu ta' żmien, f'intervalli definiti ta' hin, it-tahlita tiġi ċentrifugata biex jiġu separati l-fażijiet. Alikuota żgħira tal-fażi bl-ilma tiġi immedjatament eżaminata għas-sustanza sperimentali; imbagħad, l-esperiment ikompli bit-tahlita oriġinali. Il-volum ta' kull alikwota individwali għandu jkun inqas minn 1 % tal-volum totali. Tiġi miżjuda mat-tahlita l-istess kwantità ta' soluzzjoni friska ta' CaCl_2 0,01 M biex jinżamm l-istess rapport hamrija/soluzzjoni, u tkompli tiġi mgawda sa l-intervall ta' hin li jmiss.

Il-perċentwaj tad-desorbiment jiġi kkalkolat f'kull punt ta' hin (D_t) u/jew intervall ta' hin ($D_{\Delta t}$) (skond l-eżiġenzi ta' l-istudju) u tiġi mpingija grafikament kontra l-hin. Jiġi kkalkolat ukoll il-koeffiċjent tad-desorbiment K_{des} fl-ekwilibriju. L-ekwazzjonijiet applikabbli kollha huma msemmija f'Data u Rapurtaġġ u Anness 5.

Riżultati ta' l-esperiment fuq il-kinetika tad-desorbiment

Tpingija grafika komuni tal-persentaġġ ta' desorbiment D_t u l-adsorbiment A_t kontra l-hin jippermettu stima tar-riversibilità tal-proċess ta' l-adsorbiment. Jekk l-ekwilibriju tad-desorbiment jintlaħaq anke f'darbtejn il-hin ta' l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment, u d-desorbiment totali ikun aktar minn 75 % ta' l-ammont adsorbit, l-adsorbiment huwa meqjus irriversibbli.

1.9.2.5.3. Izotermini tad-desorbiment

L-izotermini tad-desorbiment skond Freundlich huma determinati fuq hamrija użata fl-esperiment fuq l-izotermini ta' l-adsorbiment. Il-prova tad-desorbiment issir kif deskritta fit-taqsim Kinetika tad-desorbiment, bl-unika differenza illi il-fażi bl-ilma tiġi analizzata darba biss, fl-ekwilibriju tad-desorbiment. Jiġi kkalkolat l-ammont ta' sustanza sperimentali desorbit. Il-kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa adsorbita fuq il-hamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment tiġi mpingija grafikament b'halha funzjoni tal-koncentrazzjoni ta' l-ekwilibriju tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni (ara Data u rapurtaġġ u Anness 5).

▼B**2. DATA U RAPURTAĠĠ**

Id-data analitika tiġi preżentata f'forma ta' tabella (ara Anness 6). Jinghataw il-miżuri u l-medji individwali kalkolati. Jinghataw rappreżentazzjonijiet grafiċi ta' l-izotermini ta' l-adsorbiment. Il-kalkoli jsiru kif deskritt hawn taht.

Għall-iskop tal-prova, huwa meqjus illi l-piż ta' 1 cm³ ta' soluzzjoni bl-ilma huwa 1 g. Ir-rapport hamrija/soluzzjoni jista' jiġi espress f'unità ta' w/w jew w/vol għall-istess figura.

2.1. ADSORBIMENT

L-adsorbiment A_{ti} huwa definit bħala l-persentaġġ tas-sustanza adsorbita fuq il-hamrija relatata mal-kwantità preżenti fil-bidu tal-prova, taht il-kondizzjonijiet sperimentali. Jekk is-sustanza sperimentali tkun stabbli u ma t'adsorbix b'mod sinifikattiv mal-ħajt tal-kontenitur A_{ti} , tiġi kkalkolata f'kull punt taħin t_i , skond l-ekwazzjoni:

$$A_{ti} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

meta:

A_{ti} = persentaġġ ta' adsorbiment fil-punt ta' ħin t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-hamrija fil-ħin t_i (µg);

m_0 = massa tas-sustanza sperimentali fil-pipetta fil-bidu tal-prova (µg).

Informazzjoni dettaljata fuq kif għandu jiġi kkalkolat il-persentaġġ ta' adsorbiment A_{ti} għall-metodi paralleli u f'serje hija mogħtija fl-Anness 5.

Il-koeffiċjent ta' distribuzzjoni K_d huwa r-relazzjoni bejn il-kontenut tas-sustanza fil-faži tal-hamrija u l-konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fis-soluzzjoni bl-ilma, taht il-kondizzjonijiet tal-prova meta jintlahaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

meta:

$C_s^{ads}(eq)$ = kontenut tas-sustanza adsorbita fuq il-hamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (µg g⁻¹);

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-faži bl-ilma fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (µg cm⁻³). Din il-konċentrazzjoni tiġi analitikament determinata billi jitqiesu il-valuri mogħtija mill-“blanks”

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza adsorbita fuq il-hamrija fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (µg);

m_{soil} = kwantità tal-faži hamrija, espressa f'massa xotta tal-hamrija (g);

V_0 = volum inizjali tal-faži bl-ilma f'kuntatt mal-hamrija (cm³).

Ir-relazzjoni bejn A_{eq} u K_d hija mogħtija minn:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

▼ B

meta:

A_{eq} = persentaġġ ta' adsorbiment fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment, %.

Il-koeffiċjent normalizzat ta' l-adsorbiment tal-karbonju organiku K_{oc} jirrelata l-koeffiċjent ta' distribuzzjoni K_d mal-kontenut ta' karbonju organiku tal-kampjun tal-hamrija:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

:meta

$\%OC$ = persentaġġ tal-karbonju organiku fil-kampjun tal-hamrija (g g^{-1}).

Il-koeffiċjent K_{oc} jirrappreżenta valur singolu li jikkarakterizza l-partizzjoni tas-sustanzi kimiċi organiċi li mhumiex polari bejn il-karbonju organiku li jinstab fil-hamrija jew fis-sediment u l-ilma. L-adsorbiment ta' dawn il-kimiċi huwa korrelatat mal-kontenut organika tas-solidu sorbeni (7); għalhekk, valuri K_{oc} jiddependu fuq karatteristiċi speċifiċi tal-frazzjonijiet umiċi li jvarjaw konsiderevolment fil-kapaċità tas-sorbiment, dovut għad-differenzi fl-origini, ġenesi, eċċ.

2.1.1. Izotermi ta' l-adsorbiment

L-ekwazzjoni ta' l-izotermi ta' adsorbiment ta' Freundlich trirrelata l-ammont tal-prova sperimentali adsorbita mal-koncentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju (ekwazzjoni 8).

Id-data tiġi trattata kif deskritt f' Adsorbiment' u, għal kull pipetta jiġi kkalkolat il-kontenut tas-sustanza sperimentali adsorbit fuq il-hamrija wara l-prova ta' l-adsorbiment ($C_s^{ads}(eq)$) banda oħra indikat bħal x/m). Jitlaq bl-idea illi l-ekwilibriju ntlahaq u illi $C_s^{ads}(eq)$ jirrappreżenta l-valur ta' l-ekwilibriju:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (7)$$

L-ekwazzjoni ta' l-adsorbiment ta' Freundlich hija murija f' (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

jew fil-forma linjari

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

meta:

K_F^{ads} = Freundlich il-koeffiċjent ta' l-adsorbiment; id-dimensjoni tiegħu huwa ta' $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ biss jekk $1/n = 1$; fil-kazi l-oħra kollha, is-slope $1/n$ huwa introdott fid-dimensjoni ta' K_F^{ads} $1 - 1/n$ $3 \text{ } 1/n - 1$ ($\mu\text{g (cm g)}$);

n = kostanti tar-regressjoni; $1/n$ ġeneralment ivarja bejn 0,7 - 1,0, li jindika illi d-data ta' sorbiment frekwentement tvarja f'it mil-linearità.

Ekwazzjonijiet (8) u (9) huma mpingija grafikament u jiġi kkalkolati l-valuri ta' K_F^{ads} u $1/n$ permezz ta' analiżi ta' rigressjoni bl-applikazzjoni ta' l-ekwazzjoni 9. Jiġi kkalkolat il-koeffiċjent tal-korrelazzjoni r_2 ta' l-ekwazzjoni logartimika is also calculated. Eżempju ta' tali grafika hia mogħtija f'Fig. 2.

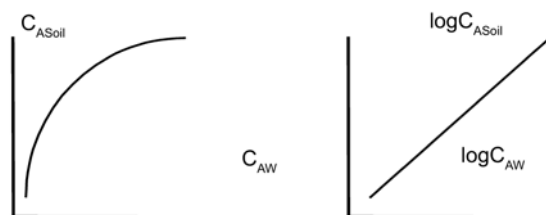
▼ B

Fig. 2. Grafika ta' adsorbiment skond Freundlich, normali u linearizzata

2.1.2. Bilanċ tal-massa

Il-bilanċ tal-massa (MB) huwa definit bhalha l-persentaġġ tas-sustanza li tista' tiġi analitikament miġbura wara prova ta' adsorbiment konta l-ammont nominali tas-sustanza fil-bidu tal-prova.

It-trattament tad-data ma jkunx l-istess jekk is-solvent ikun jista' jithallat kompletament ma' l-ilma. Fil-każ ta' solvent li jista' jithallat ma' l-ilma, it-trattament ta' data deskritta taht “Desorbiment” jista' jiġi applikat biex jiġi stabbilit l-ammont ta' sustanza miġbura mill-estrazzjoni tas-solvent. Jekk is-solvent jithallat inqas faċilment ma' l-ilma, trid issir determinazzjoni ta' l-ammont miġbur.

Il-bilanċ tal-massa MB għall-adsorbiment jiġi kkalkolat kif ġej; huwa preżunt illi (m_E) jikkorrispondi għas-somma tal-massa tal-prodotti kimiċi estratti mill-ħamrija u mill-wieċ tal-kontenitur permezz ta' solvent organiku:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

meta:

MB = bilanċ tal-massa(%)

m_E = massa totali tal-prova sperimentali estratta mill-ħamrija u mill-ħitan tal-kontenitur sperimentali f'żewġ stadji (μg);

C_0 = konċentrazzjoni inizjali tal-massa tas-soluzzjoni sperimentali f'kuntatt mal-ħamrija ($\mu g \text{ cm}^{-3}$);

V_{rec} = volum tas-supernatant miġbur wara l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (cm^{-3}).

2.2. DESORBIMENT

Id-desorbiment (D) huwa definit bhala l-persentaġġ tas-sustanza sperimentali li tiġi desorbata, b'referenza għall-kwantità tas-sustanza preċedentement adsorbata, fil-kondizzjonijiet sperimentali:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

meta:

D_{t_i} = persentaġġ ta' desorbiment f'punt ta' hin t_i (%);

▼ B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija f'punt ta' ħin (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza sperimentali adsorbita fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju ta' -adsorbiment (μg).

Informazzjoni dettaljata fuq kif għandu jiġi kkalkolat il-persentaġġ ta' desorbiment D_i għall-metodi paralleli u f'serje hu mġhoti fl-Anness 5.

Il-koeffiċjent tad-desorbiment apparenti (K_{des}), taht il-kondizzjonijiet sperimentali, huwa r-rapport bejn il-kontenut tas-sustanza li tibqa fil-fażi ħamrija u l-konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza desorbita fis-soluzzjoni bl-ilma, meta jintlaħaq l-ekwilibriju tad-desorbiment:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

meta:

K_{des} = il-koeffiċjent tad-desorbiments ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa totali tas-sustanza sperimentali desorbita mill-ħamrija fl-ekwilibriju tad- desorbiment (μg)

V_T = volum totali tal-fażi bl-ilma f'kuntatt mal-ħamrija matul il-prova tal-kinetika tad-desorbiment (cm^3).

Gwida biex jiġi kkalkolat $m_{aq}^{des}(eq)$ hija mogħtija fl-Anness 5 taht l-intestatura "Desorbiment".

Rimarka:

Jekk il-preċedenti prova ta' adsorbiment, issir bil-metodu paralleli, il-volum V_T fl-ekwazzjoni 12 huwa meqjus ugwali għal V_0 .

2.2.1. Iżotermi tad-desorbiment

L-ekwazzjoni ta' l-iżotermi tad-desorbiment ta' Freundlich jikkollegaw il-kontenut tas-sustanza sperimentali li tibqa adsorbita fuq il-ħamrija mal-konċentrazzjoni tas-sustanza sperimentali fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju tad-desorbiment (ekwazzjoni 16).

Għal kull pipetta, il-kontenut tas-sustanza li jibqa adsorbit fuq il-ħamrija fl-ekwilibriju tad-desorbiment jiġi kkalkolat kif ġej:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ jiġi definit bħalha:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_F} - m_{aq}^A \text{ (}\mu\text{g)} \quad (14)$$

fejn:

$C_s^{des}(eq)$ = kontenut tas-sustanza sperimentali li jibqa' adsorbit fuq il-ħamrija fl-s ekwilibriju tad-desorbiment ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$m_m^{des}(eq)$ = il-massa tas-sustanza determinata b'mod analitiku fil-fażi akwea fl-ekwilibriju tad-desorbiment (μg);

▼ B

m_{aq}^A = il-massa tas-sustanza għat-test imħolli mill-ekwilibriju minhabba r-rimpjazzar inkomplet tal-volum (μg);

$m_{aq}^{\text{des}}(\text{eq})$ = il-massa tas-sustanza fis-soluzzjoni fl-ekwilibriju ta' l-adsorbiment (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_r^F = volum tas-soluzzjoni meħud mill-pipetta għall-kejl tas-sustanza sperimentali (cm^3);

V_R = volum tas-supernatant mneħhi mill-pipetta wara li jkun intlaħaq l-ekwilibriju ta' l-adsorbiment u sostitwit bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M CaCl_2 solution (cm^3);

L-ekwazzjoni ta' desorbiment skond Freundlich hija mogħtija f (16):

$$C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = K_F^{\text{des}} \cdot C_{aq}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

jew fil-forma lineari

$$\log C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_F^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

meta:

K_F^{des} = koeffiċjent ta' desorbiment skond Freundlich;

n = kostanti ta' rigressjoni;

$C_{aq}^{\text{des}}(\text{eq})$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fil-fażi bl-ilma fl-ekwilibriju tad-desorbiment ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

L-ekwazzjonijiet 16 u 17 jistgħu jitpingew grafikament u il-valur ta' K_F^{des} u $1/n$ jiġu kkalkolati bl-analiżi tar-rigressjoni bl-użu ta' l-ekwazzjoni 17.

Rimarka:

Jekk l-esponenti $1/n$ ta' adsorbiment jew desorbiment, skond Freundlich, huwa ugwali għal 1, il-vinkoli kostanti ta' l-adsorbiment jew tad-desorbiment skond Freundlich (K_F u K_F^{des}) ikunu ugwali, rispettivamente, għal kostanti ta' l-ekwilibriju fl-adsorbiment jew fid-desorbiment (K_F^{ads} u K_F^{des}), u it-tpingija grafika ta' C_s vs C_{aq} tkun lineari. Jekk l-esponenti ikunu differenti minn 1, it-tpingija grafika ta' C_s vs C_{aq} ma tkunx lineari u l-kostanti ta' l-adsorbiment u d-desorbiment ivarjaw matul l-izotermi.

2.2.2. **Rapport tal-prova**

Ir-rapport tal-prova għandu jindika l-informazzjoni li ġejja:

— Identifikazzjoni kompleta tal-kampjuni tal-hamrija użat inkluż:

— referenza geografika tal-lokalità (latitudni, longitudni),

— data meta jittiehed il-kampjun,

▼B

- skema ta' impieg (e.ż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.),
- fond ta' fejn jittiehed il-kampjun,
- kontenut f'ramel/torba/tafal,
- valuri tal-pH (bħal CaCl_2 0,01 M),
- kontenut f'karbonju organiku,
- kontenut f'sustanza organika,
- kontenut f'nitroġenu,
- rapport C/N,
- kapaċità ta' skambjar katjoniku (mmol/kg),
- l-informazzjoni kollha dwar il-kollezzjoni u l-ħażna tal-kampjun tal-ħamrija,
- meta approprijat, l-informazzjoni kollha rilevanti għall-interpretazzjoni ta' l-adsorbiment desorbiment tas-sustanza sperimentali,
- referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru,
- informazzjoni fuq is-sustanza sperimentali, kif xieraq,
- temperatura ta' l-esperimenti,
- kondizzjonijiet taċ-ċentrifugazzjoni,
- proċedura analitika użata biex tiġi analizzata s-sustanza sperimentali,
- justifikazzjoni għall-użu ta' kwalsiasi aġent solubilizzanti għat-tlestija tas-soluzzjoni maħżuna tas-sustanza sperimentali,
- spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet magħmula fil-kalkoli, jekk rilevanti,
- data skond il-formularju (Anness 6) u preżentazzjonijiet grafiċi,
- l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jistgħu ikunu utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati tal-provi.

3. **REFERENZI**

- (1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.
- (2) Fränzle O., Kuhnt G. AND Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.
- (3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
- (5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

- (6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
- (7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- (8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- (9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health and especially harmful to the environment.
- (11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- (12) Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in *Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil* (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- (13) Calvet R., (1980), "Adsorption-Desorption Phenomena" in *Interactions between herbicides and the soil*. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
- (14) Hassett J. J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.
- (15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Vol. 38(1), pp. 29-35.
- (16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in *Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants*. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- (17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". *Weeds*, 13, pp. 185-190.
- (18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". *J. Agric. Food Chem.*, 18, pp. 524-528.
- (19) Russell M. H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in *Environmental Behavior of Agrochemicals* (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- (20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", *IUPAC Reports on Pesticides* (24). *Pure Appl. Chem.*, 60, pp. 901-932.

▼B

- (21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.
- (22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 269-273.
- (23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.
- (24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.
- (25) Osgerby J. M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.
- (26) Guth J. A., (1972), "Adsorptions-und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.
- (27) Hamaker J. W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
- (28) Helling C. S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.
- (29) Hamaker J. W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.
- (30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.
- (31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (32) Gustafson D. I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.
- (33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.
- (34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, pp. 389-395.
- (35) Green R. E., and Karickhoff S. W., (1990), "Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,
- (36) Lambert S. M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼ B

- (37) Hance R. J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". *J. Agri. Food Chem.*, 17, pp. 667-668.
- (38) Briggs G. G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". *Nature*, 223, 1288.
- (39) Briggs G. G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". *J. Agric. Food Chem.*, 29, pp. 1050-1059.
- (40) Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". *J. Agric. Food Chem.*, 32, pp. 243-246.
- (41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". *Residue Rev.*, 32, pp. 29-92.
- (42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32: pp. 222-234.
- (43) Karickhoff S. W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere* 10, pp. 833-846.
- (44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". *Environ. Toxicol. Safety* 21, pp. 1-17.
- (45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), "Adsorption in organic chemicals" in *Organic Chemicals in the Soil Environment* (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
- (46) Deli J., and Warren G. F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". *Weed Sci.* 19: pp. 67-69.
- (47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, pp. 454-457.
- (48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
- (49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- (50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- (51) Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- (52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

- (53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- (54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- (55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.
- (56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- (57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- (58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), “Precision in pesticide adsorption measurements”. *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, pp. 353-354.
- (60) Grover R., and Hance R. J. (1970), “Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine”. *Soil Sci.*, pp. 109-138.
- (61) Boesten, J. J. T. I., “Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system”. *Pest. Sci.* 1990, 30, pp. 31-41.
- (62) Boesten, J. J. T. I. “Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106”. *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.*
- (63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), “Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique”. *Weed Res.* 21, pp. 227-231.
- (64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), “Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments”. *J. Environ. Qual.*, 10(3), pp. 382-386.
- (65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), “Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water”. *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), pp. 227-231.
- (66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), “Sorption of organic substances by soils and sediments”. *J. Environm. Sci. Health, B19* (3), pp. 297-312.
- (67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C., (1987), “Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons”. *Chemosphere*, 16(1), pp. 109-116.
- (68) Lyman W. J., Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds.* American Chemical Society, Washington DC.
- (69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). “Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota” in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

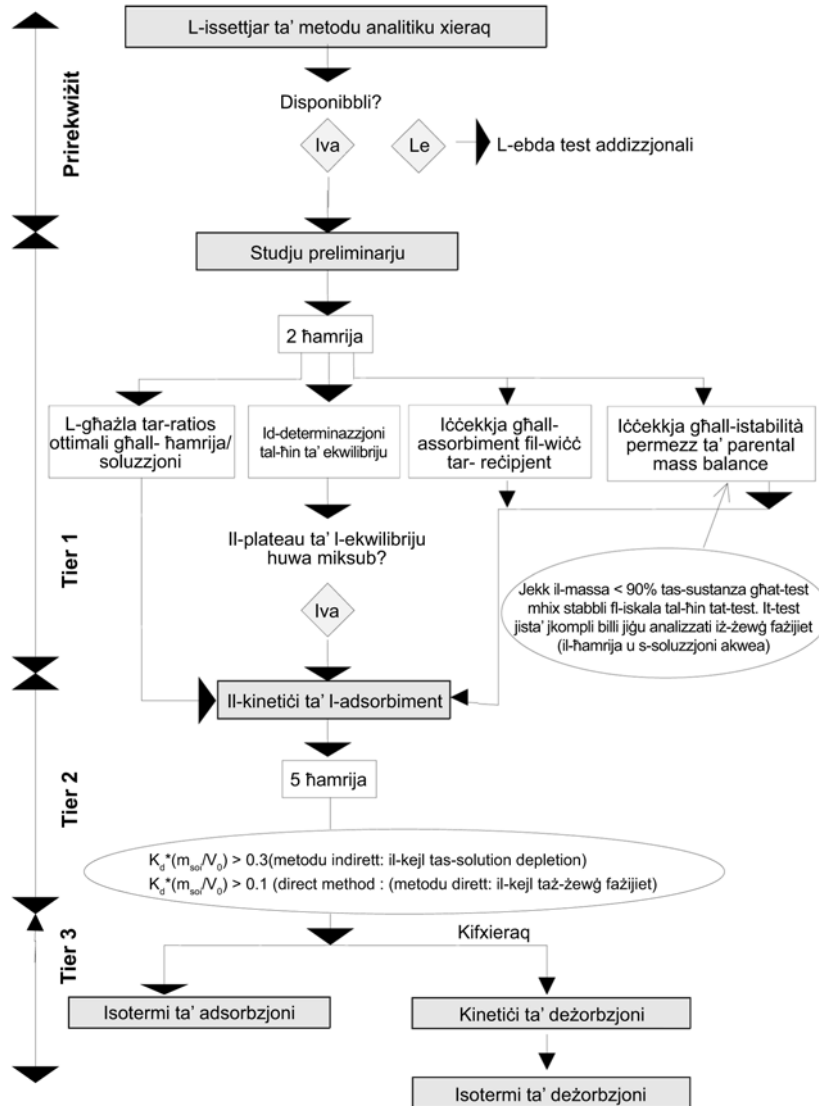
▼B

- (70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, pp. 831-832.
- (71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), "Sorption of/-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, pp. 38-42.
- (72) Karickhoff S. W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), pp. 833-846.
- (73) Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité". *Revue de l'Agric.*, 34 (4), pp. 319-322.
- (74) Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493-2504.
- (75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), pp. 1373-1384.
- (76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases". *Chemosphere* 27 (12), pp. 2341-2352.
- (77) Hance, R. J., (1967), "The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
- (78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
- (79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- (80) Giles C. H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.
- (81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), "Studies in adsorption: XI A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, pp. 3973-93.
- (82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: pp. 239-251.
- (83) Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.
- (84) Guth, J. A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
- (85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).



ANNEX I

Skema tal-prova





ANNEX 2

**INFLUENZA TA' PREĊIŻJONI TA' METODU ANALITIKU U BIDLA
FIL-KONĊENTRAZZJONI FUQ PREĊIŻJONI TA' RIŻULTATI TA' L-
ASSORBIMENT**

Mit-tabella li ġejja (84) jidher ċar li meta d-differenza bejn il-massa inizjali ($m_0=110 \mu\text{g}$) u lads massa ta' l-ekwilibriju ($m_{\text{aq}}(\text{eq})=100 \mu\text{g}$) tas-sustanza għat-test fis-soluzzjoni hi ċkejna ħafna, żball ta' 5 % fil-kejl tar-riżultati tal-konċentrazzjoni ta' l-ekwilibriju fi żball ta' 50 % fil-kalkolu tal-massa tas-sustanza adsorbita fil-hamrija ($m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$) u ta' 52,4 % fil-kalkolu ta' K_d .

Lammont ta'hamrija $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$
Il-volum tas-soluzzjoni $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg)	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	R	$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg)	$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$R_{\ddagger}$	$K^{\text{d}*}$	$R_{\ddagger}$
$m_0 = 110 \mu\text{g jew}$ $C_0=1,100 \mu\text{g/cm}^3$	GHAL A = 9 %							
	100	1,000	true value	10	1,00	true value	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
$m_0 = 110 \mu\text{g jew}$ $C_0=1,100 \mu\text{g/cm}^3$	GHAL A = 55 %							
	50,0	0,500	Valur aawtentiku	60,0	6,00	Valur aawtentiku	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
$m_0 = 110 \mu\text{g jew}$ $C_0=1,100 \mu\text{g/cm}^3$	FOR A = 99 %							
	1,100	0,011	true value	108,9	10,89	true value	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}. K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = il-massa tas-sustanza għat-test fil-faži tal-hamrija f'ekwilibriju, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = il-massa tas-sustanza għat-test fil-faži tal-hamrija f'ekwilibriju, μg ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = il-kontenut tas-sustanza għat-test fil-faži tal-hamrija f'ekwilibriju, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = konċentrazzjoni ta' massa tas-sustanza għat-test fil-faži akwea f'ekwilibriju, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = żball analitiku fid-determinazzjoni tal- $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

$R_{\ddagger}$ = żball kalkulat minhabba l-iżball analitiku R.



ANNEX 3

METODI TA' TEKNIKA TA' STIMA GHAL K_d

1. Tekniki ta' kalkolu jippermettu t-tbassir ta' K_d ibbażata fuq il-korrelazzjoni ma', pre eżempju, P_{ow} valuri (12)(39)(63-68), id-*data* tas-solubilità ta' l-ilma (12)(19)(21)(39)(68-73), jew id-*data* tal-polarità derivata bl-applikazzjoni ta' HPLC fuq il-fażi reversed (74-76). Kif jidher fit-Tabelli 1 u 2, huwa K_{oc} jew K_{om} li huma kkalkulati minn dawn l-ekwazzjonijiet imbagħad, indirettament, il- K_d mill-ekwazzjonijiet:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

2. Il-kunċett ta' dawn il-korrelazzjonijiet huwa bbażat fuq żewġ suppożizzjonijiet: (1) hija l-materja organika tal-hamrija li prinċiparjament tinfluenza l-assorbiment ta' sustanza; u (2) l-interactions involuti huma prinċiparjament non-polari. B'riżultat ta' dan, dawn il-korrelazzjonijiet: (1) m'humiex, jew huma biss sa ċertu punt, applikabbli għal sustanzi polari, u (2) m'humiex applikabbli f'każijiet fejn il-kontenut tal-materja organika tal-hamrija hija żgħira hafna (12). Barra dan, għalkemm instabu korrelazzjonijiet sodisfaċenti bejn P_{ow} u assorbiment (19), ma jistax jingħad l-istess għar-relazzjoni bejn is-solubilità ta' l-ilma u miżura ta' assorbiment (19) (21); s'issa l-istudji huma kontradittorji hafna.
3. Xi eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-koeffiċjent ta' l-assorbiment u l-koeffiċjent tat-taqsimu ta' ilma-ottan, kif ukoll is-solubilità ta' l-ilma huma mogħtija f'Tabelli 1 u 2, ripettivament.

Tabella 1.

Eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-koeffiċjent tad-distribuzzjoni ta' assorbiment u l-koeffiċjent tat-taqsimu ta' ilma-ottan; għal iktar eżempji (12) (68)

Sustanzi	Korrelazzjonijiet	Awturi:
Ureas sostituti	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Fihom il-kloru aromatiċi	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Diversi pestiċidi	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Idrokarbon aromatiċi	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabella 2.

Eżempji ta' korrelazzjonijiet bejn il-koeffiċjent tad-distribuzzjoni ta' assorbiment u solubilità ta' l-ilma; għal iktar eżempji ara (68) (69)

Kompost	Korrelazzjonijiet	Awturi
Diversi pestiċidi	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Sustanzi li fihom il-kloru, alifatiċi, u aromatiċi	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α - naftal	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Sustanzi aromatiċi, alifatiċi u ċikliċi	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp-25})$	Karickhoff (1981) (72)
Diversi komposti	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

ANNEX 4

KALKOLI BIEX JIĠU DEFINITI L-KONDIZZJONIJIET TA' L-AZZJONI ĊENTRIFUGA

1. Il-hin ta' azzjoni ċentrifuga jingħata bil-formula li ġejja, jekk nassumu li hemm partiċelli sferikali:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln (R_b/R_t) \quad (1)$$

Għal skopijiet ta' simplifikazzjoni, il-parametri kollha huma deskritti f'unitajiet non-SI (g, cm).

fejn:

ω = veloċità tar-rotazzjoni (=2 p rpm/60), rad s⁻¹;

rpm = dawriet shaħ għal kull minuta

η = viskożità tas-soluzzjoni, g s⁻¹ cm⁻¹;

r_p = radju tal-partiċella, cm

ρ_s = densità tal-ħamrija, g cm⁻³;

ρ_{aq} = densità tas-soluzzjoni, g cm⁻³;

R_t = distanza miċ-ċentru ta' rotor ċentrifugu sal-wiċċ tas- soluzzjoni fit-tubu ċentrifugu, cm;

R_b = distanza miċ-ċentru tar-rotor ċentrifuga sal-qiegh tat- tubu ċentrifugu, cm;

R_b-R_t = l-gholi tal-ħamrija/tahlita tas-soluzzjoni fit-tubu ċentrifugu, cm.

Fil-prattika ġenerali, jiġu użati d-doppju tal-hinijiet ikkalkulati biex tiġi assicurata separazzjoni kompleta.

2. L-ekwazzjoni (1) tista' tiġi ssimplifikata iktar jekk nikkunisdraw il-viskożità (η) u d- densità (ρ_{aq}) tas-soluzzjoni bħala daqs il-viskożità u d-densità ta' ilma f 25 °C; għalhekk, $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$ g¹cm⁻¹ u $\rho_{aq} = 1,0$ g.cm⁻³.

Imbagħad, il-hin ta' l-azzjoni ċentrifuga jiġi mogħti bl-ekwazzjoni (2):

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Mill-ekwazzjoni 2 jidher ċar li ż-żewġ parametri huma importanti biex tiġi definita l-kondizzjoni ta' l-azzjoni ċentrifuga, i.e. hin (t) u veloċità (rpm), sabiex tinkiseb is-separazzjoni tal-partiċelli ta' daqs speċifiku (fil-każ tagħna radju ta' μm): (1) id-densità tal-ħamrija u (2) it-tul tat-tahlita fit-tubu ċentrifugu (R_b-R_t), i.e. id-distanza li partiċella tal-ħamrija tiksi mill-wiċċ tas-soluzzjoni sal-qiegh tat-tubu; ovvjament, għal volum fiss it-tul tat-tahlita fit-tubu sejjer jiddependi fuq ir-radiċi kwadrata tar-radju tat-tubu.

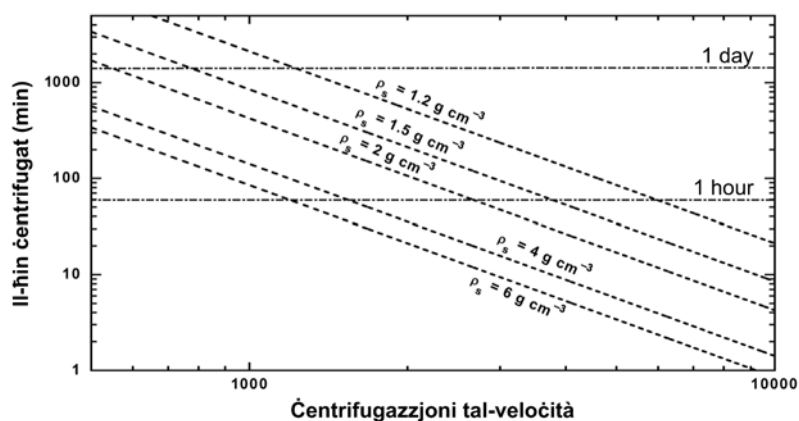
4. Fig. 1 jippreżenta varjazzjonijiet fil-hin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versu veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal densitajiet ta' ħamrija differenti (ρ_s) (Fig. 1a) u tulijiet differenti tat-tahlita fit-tubi ċentrifugi (ρ_s) (Fig. 1b). Minn Fig. 1a l-influenza tad-densità tal-ħamrija tidher ovvja; per eżempju, għall-azzjoni ċentrifuga klassika ta' 3000 rpm il-hin ta l-azzjoni ċentrifuga huwa bejn wiehded u iehor 240 min. għal 1,2 g cm³ densità tal-ħamrija, waqt li huwa 50 min. biss għal 2,0 g cm³. Bl-istess mod, minn Fig. 1b, għal azzjoni ċentrifuga klassika ta' 3000 rpm il-hin ta' l-azzjoni ċentrifuga huwa bejn wiehded u iehor 50 min. għal tul tat-tahlita ta' 10 cm u huwa ta' 7 min. biss għal tul ta' 1 cm. Madankollu, huwa importanti li tinstab l-aħjar relazzjoni bejn l-azzjoni ċentrifuga li tehtiegħ l-inqas tul possibbli u handling faċli għall-esperimentatur biex jissepara l-phases wara l-azzjoni ċentrifuga.

▼B

5. Barra dan, meta jiġu definiti l-kondizzjonijiet esperimentali għas-separazzjoni ta' phases tal-hamrija/soluzzjoni, huwa importanti li tiġi kkunsidrata l-possibiltà ta' l-eżistenza tat-tielet "pseudo-phase", il-kollojde. Dawn il-partiċelli, ta' daqs inqas minn $0,2 \mu\text{m}$, jista' jkollhom impatt importanti fuq il-mekkanizmu ta' l-assorbiment shih ta' sustanza f suspension tal-hamrija. Meta l-azzjoni ċentrifuga tiġi esekwita kif spjegat hawn fuq, kollojde jibqgħu fl-aqueous phase u huma suġġetti għal analiżi flimkien m' l-aqueous phase. Għalhekk, l-informazzjoni dwar l-impatt tagħhom tintilef

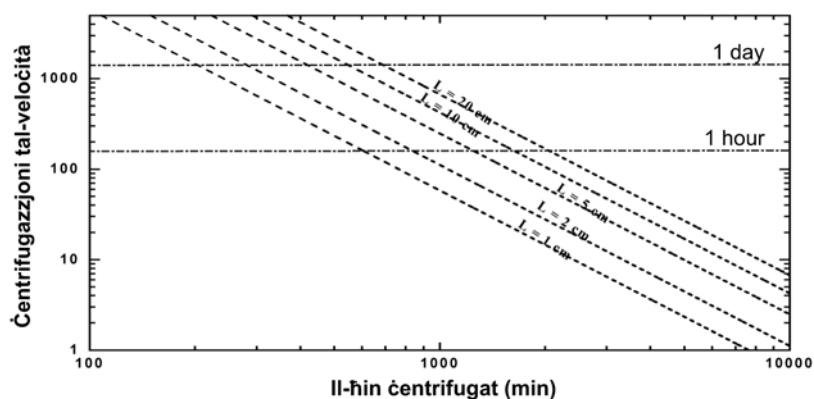
Jekk il-laboratorju amministrattiv ikollu faċilitajiet ta' azzjoni ultra-ċentrifuga jew ultrafiltrazzjoni, l-assorbiment/desorption ta' sustanza fil-hamrija tista' tiġi studjata fiktur dettall, inkluża informazzjoni dwar l-assorbiment tas-sustanza fuq il-kollojde. F'dan il-każ, azzjoni ultra-ċentrifuga b'60 000 rpm/min. jew ultrafiltrazzjoni b'porożità tal-filtru ta' 100 000 Daltons għandha tiġi applikata sabiex jiġu sseparati it-tliet phases, hamrija, kollojde, soluzzjoni. Il-protokoll ittestjat għandu jiġi wkoll modifikat skond il-bżonn, sabiex it-tliet phases kollha jkunu suġġetti għal analiżi tas-sustanza.

Fig. 1a.



Varjazzjonijiet tal-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versus l-veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal densitajiet ta' hamrija differenti (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ u $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ f 25°C .

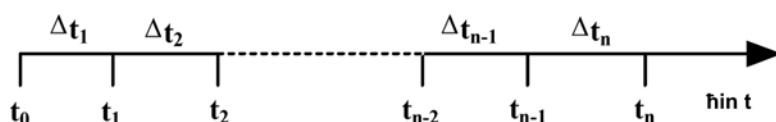
Fig. 1b.



Varjazzjonijiet tal-ħin ta' l-azzjoni ċentrifuga (t) versus veloċità ta' l-azzjoni ċentrifuga (rpm) għal tulijiet differenti tat-tahlita fit-tubu ċentrifugu ($R_b - R_t$) = L ; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ f 25°C u $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

▼ B*ANNEX 5***KALKOLU TA' ASSORBIMENT A (%) U DESORPTION D (%)**

L-iskema tal-hin tal-proċedura hija:



Għall-kalkoli kollha huwa meqjus li s-sustanza tat-test hija stabbli u ma tassorbix b'mod sinifikanti mal-ġnub tal-kontenitur.

ASSORBIMENT A (A %)**(a) Metodu parallel**

L-assorbiment perċentwali huwa kkalkulat għal kull tubu tat-testijiet (i) f'kull punt ta' ħin (t_i), skond l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

It-termini ta' din l-ekwazzjoni jistgħu jiġu kkalkulati kif ġej:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

fejn:

A_{t_i} = il-perċentwal ta' l-assorbiment (%) f'dan il-punt tal-ħin t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = massa tas-sustanza ttestjata fuq il-hamrija fil-ħin t_i li l-analizi ġiet esegwita (μg)

m_0 = massa tas-sustanza tat-test fit-tubu tat-testijiet, fil-bidu tat-test (μg)

C_0 = konċentrazzjoni tal-massa inizjali tas-soluzzjoni tat-test f'kontatt mal-hamrija ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

▼ B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza fl-aqueous phase fil- t_i li fih giet esekwita l-analiżi ($\mu\text{g cm}^{-3}$); din il-konċentrazzjoni hija ffixxata analitikament meta jitqiesu l-valuri mogħtija mill-

V_0 = volum inizjali tas-soluzzjoni ttestjata mal-ħamrija (cm^3).

Il-valuri tal-persentaġġ ta' l-assorbiment A_{t_i} jew $C_{aq}^{ads}(t_i)$ huma pplottjati versu t_i u huwa ddeterminat il-ħin li jittiehed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tas-sorpsion. Eżempji ta' plots bħal dawn huma mogħtija f'Fig. 1 u Fig. 2 rispettivament.

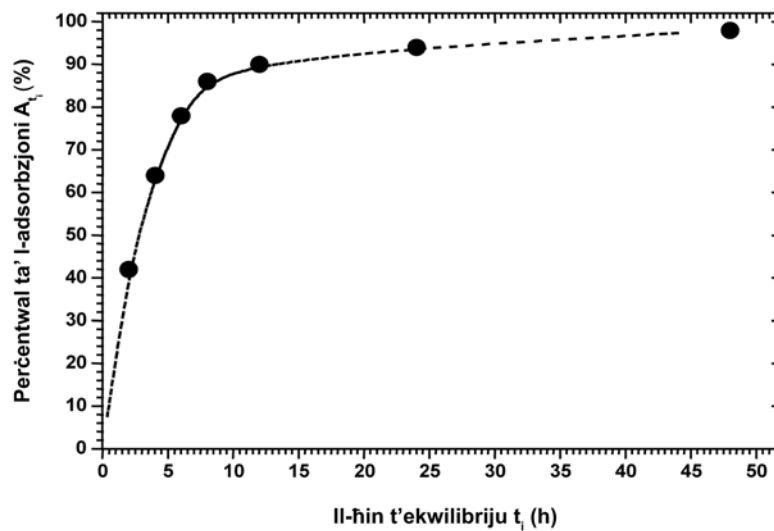


Fig. 1.

Plot ta l-ekwilibriju ta' l-assorbiment

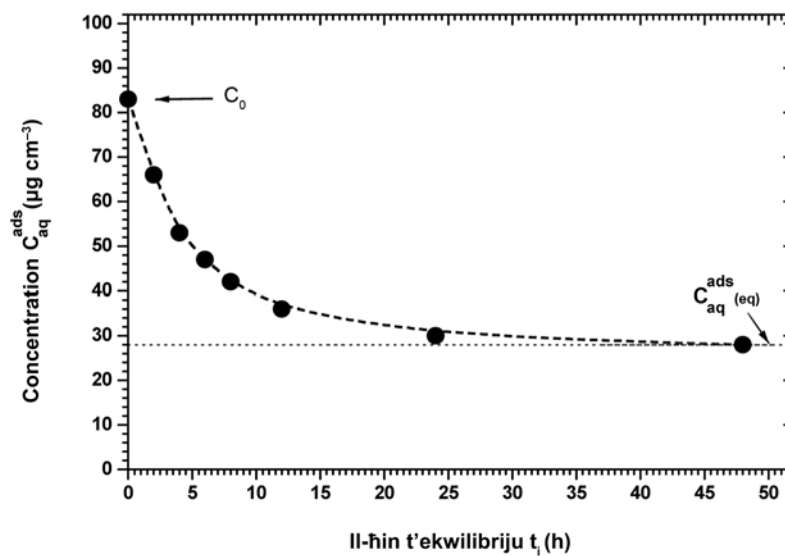


Fig. 2.

Konċentrazzjoni tal-massa tas-sustanza ttestjata fl-aqueous phase (C_{aq}) versu t_i

▼B(b) *Metodu serial*

L-ekwazzjonijiet li ġejjin jiehdu qies li l-proċedura ta' l-assorbiment hija mwettqa permezz ta' kejl tas-sustanza tat-test f'alikwoti żgħar ta' l-aqueous phase f'intervalli ta' ħin speċifiċi.

— Matul kull intervall ta' ħin l-ammont tas-sustanza assorbita fuq il-hamrija hija kkalkulata kif ġej:

— għall-ewwel intervall ta' ħin $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

— għat-tieni intervall ta' ħin $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

— għat-tielet intervall ta' ħin $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (6)$$

— għall-nth intervall ta' ħin $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (7)$$

— Il-persentaġġ ta' assorbiment għal kull intervall ta' ħin, $A_{\Delta t_i}$, huwa kkalkulat permezz ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (8)$$

waqt li l-persentaġġ ta' assorbiment A_{t_i} f' punt tal-ħin t_i jingħata b'din l-ekwazzjoni:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (9)$$

Il-valuri ta' l-assorbiment A_{t_i} jew $A_{\Delta t_i}$ (dwar il-bżonnijiet ta' l-istudju) huma pplottjati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittiehed biex jintlaħaq l-ekwilibriju tas-sorption.

— Fil-ħin ta' l-ekwilibriju t_{eq} :

— il-massa tas-sustanza tat-test assorbita fuq il-hamrija hija:

$$m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼ B

— il-massa tas-sustanza ttestjata fis-soluzzjoni hija:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— u l-persentaġġ ta' assorbiment waqt ekwilibriju huwa:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Il-parametri użati hawn fuq huma definiti bħala:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massa tas-sustanza assorbita fuq il-
hamrija matul l-intervalli tal-hin $\Delta t_1,$
 $\Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ rispettivament (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = mass of the substance measured in
an aliquot v_a^A at the time points $t_1,$
 t_2, t_n respectively (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza assorbita fuq il-
hamrija waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa tas-sustanza fis-soluzzjoni
waqt ekwilibriju ta' l-assorbiment (μg);

v_a^A = volum ta' l-alikwot li fih tiġi mkejla
s-sustanza ttestjata (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = persentaġġ ta' assorbiment li jikkor-
rispondi f'intervall ta' hin Δt_i (%);

A_{eq} = persentaġġ ta' assorbiment waqt
ekwilibriju ta' l-assorbiment (%).

DESORPTION D (%)

Il-hin t_0 li fih jibda l-esperiment tal-kinetika tad-desorption, huwa kkunsidrat bħala l-mument li l-ikbar ammont ta' volum akkwistat tas-soluzzjoni tas-sustanza tat-test (wara dan jintlaħaq l-assorbiment ta' ekwilibriju) huwa mibdul b'volum ugwali ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$.

(a) Metodu parallel

Fil-punt tal-hin t_i , il-massa tas-sustanza tat-test hija mkejla fl-aqueous phase meħuda mit-tubu i (V_r^i), u l-massa desorbed hija kkalkulata skond din l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Waqt l-ekwilibriju tad-desorption $t_i = t_{eq}$, u għalhekk $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Il-massa tas-sustanza tat-test desorbed matul intervall ta' hin (Δt_i) tingħata permezz ta' din l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Il-persentaġġ ta' desorption huwa kkalkulat:

fil-punt tal-hin t_i mill-ekwazzjoni:

▼ B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (15)$$

u matul intervall ta' ħin (Δt_i) mill-ekwazzjoni:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (16)$$

fejn:

D_{t_i} = il-persentaġġ ta' desorption f punt ta' ħin t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = il-persentaġġ ta' desorption li jikkorrispondi ma' intervall ta' ħin Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = il-massa tas-sustanza tat-test desorbed f punt tal-ħin t_i , (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = il-massa tas-sustanza tat-test desorbed matul intervall ta' ħin Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = il-massa tas-sustanza tat-test mkejla analitikament fħin t_i f volum tas-soluzzjoni V_r^i , li jittiehed għall-analizi (μg);

m_{aq}^A = il-massa tas-sustanza tat-test li tibqa' mill-ekwilibriju ta' assorbiment dovut għall-bdil tal-volum inkomplet (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = il-massa tas-sustanza tat-test fis-soluzzjoni waqt ekwilibriju ta' assorbiment (μg)

V_R = il-volum tas-supernatant imnehhi mit-tubu wara li jintlahaq ekwilibriju ta' assorbiment u mibdul bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);

V_r^i = il-volum tas-soluzzjoni meħuda mit-tubu (i) għall-kejl tas-sustanza tat-test, fl-esperiment tal-kinetika tad-desorption (cm^3).

Il-valuri ta' desorption D_{t_i} jew $D_{\Delta t_i}$ (skond il-htigijiet ta' l-istudju) huma pplotjtati versu ħin u huwa ddeterminat il-ħin li jittiehed biex jintlahaq l-ekwilibriju tad-desorption.

(b) Metodu serial

L-ekwazzjonijiet li ġejjin jiehdu qies li l-proċedura ta' assorbiment, li kienet ippreċeduta, kienet imwettqa permezz tal-kejl tas-sustanza tat-test f alikwoti żgħar (v_a^A) ta' l-aqueous phase (metodu serial fl.9. Andament tat-test). Huwa meqjus li: (a) il-volum tas-supernatant imnehhi mit-tubu wara l-esperiment ta' l-kinetika ta' l-assorbiment kien mibdul bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $CaCl_2$ solution (V_R) u (b) u l-volum totali ta' l-aqueous phase fkuntatt mal-ħamrija (V_T) matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorption jibqa' kostanti u jingħata b'din l-ekwazzjoni:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

▼ B

Fpunt tal-hin t_i :

- il-massa tas-sustanza tat-test hija mkejla falikwot $zghir$ (v_a^D) u l-massa desorbed hija kkalkulata, skond l-ekwazzjoni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- waqt ekwilibriju ta' desorption $t_i = t_{eq}$ u għalhekk $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$
- Il-persentaġġ ta' desorption D_{t_i} huwa kkalkulat, mill-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (20)$$

F'intervall ta' hin (Δt_i):

Matul kull intervall ta' hin l-ammont tas-sustanza desorbed huwa kkalkulat kif ġej:

- għall-ewwel intervall ta' hin $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- għat-tieni intervall ta' hin $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \quad (22)$$

u

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)]$$

- għall-nth intervall $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq i}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right) \right] u \quad (23)$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq i}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Finalment, il-persentaġġ ta' desorption għal kull interval ta' hin, $D_{\Delta t_i}$, huwa kkalkulat permezz ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (24)$$

waqt li l-persentaġġ ta' desorption D_{t_i} fpunt tal-hin t_i jingħata permezz ta' l-ekwazzjoni:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (25)$$

▼ B

fejn il-parametri użati hawn fuq huma definiti bħala:

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1), m_s^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = il-massa tas-sustanza li tibqa' assorbita fuq il-ħamrija wara l-intervalli tal-ħin $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ rispettivament (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = il-massa tas-sustanza tat-test matul l-intervalli tal-ħin rispettivament (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = Il-massa tas-sustanza mkejla f'*aliquot*(v_a^D) f'punti tal-ħin $t_1, t_2, \dots, t_n$, rispettivament (μg)

V_T = il-volum totali ta' l-aqueous phase f'kuntatt mal-ħamrija matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorption-sekwit bil-metodu serial (cm^3);

m_{aq}^A = il-massa tas-sustanza tat-test li jibqa' mill-ekwilibriju ta' lassorbiment dovut għall-bdil tal-volum inkomplet (μg)

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = il-volum tas-supernatant mneħhi mit-tubu wara li jintlaħaq ekwilibriju ta' assorbiment u jinbidel bl-istess volum ta' soluzzjoni 0,01 M $\text{CaCl}_2(\text{cm}^3)$

v_a^D = il-volum ta' l-alikwot meħuda bħala kampjun għal skop analitiku mit-tubu (i), matul l-esperiment tal-kinetika tad-desorption mwettaq bil-metodu serial (cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$



ANNEX 6

ASSORBIMENT-DESORPTION FIL-HAMRIJA: KARTI GHAR-RAPPORT TAD-DATA

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut ta' *dry mass* tal-ħamrija (105 °C, 12h): %

it-temperatura: °C

L-adattament tal-metodu analitiku

Il-ħamrija miżunal	g	
Il-ħamrija: <i>dry mass</i>	g	
Il-volum CaCl ₂ sol.	cm ³	
konk.nominali sol.finali	µg cm ⁻³	
Konk. analitiku sol.finali	µg cm ⁻³	

Il-prinċipju tal-metodu analitiku wżat:

Il-kalibrazzjoni tal-metodu analitiku:

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata

Il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija (105 °C, 12 h): %

it-temperatura: °C

Il-metodologija analitika ta' wara: Indirett ☐ Parallel ☐ Serjali ☐

Dirett ☐

It-test ta' adżorbzjoni: il-kamjuni għat-test

	Simbolu	Unitajiet	Il-hint'ekwilib-razzjoni	Il-hint'ekwilib-razzjoni	Il-hint'ekwilib-razzjoni	Il-hint'ekwilib-razzjoni
In-nru tat-tubu						
Il-ħamrija miżuna	—	g				
Il-ħamrija: <i>dry mass</i>	m _{soil}	g				
Il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kalkulat)	V _{WS}	cm ³				
Il-volum 0,01 M CaCl ₂ sol. Biex jekwilibrizza l-ħamrija		cm ³				
Il-volum ta' <i>stock solution</i>		cm ³				
Il-volum totali tal-fażi akwea. F'kuntatt mal-ħamrija	V ₀	cm ³				
Is-soluzzjoni ta' konċentrazzjoni għat-test inizjali	C ₀	µg cm ⁻³				
Is-sustanza tal-massa għat-test fil-bidu tat-test	m ₀	µg				

▼B

	Simbolu	Unitajiet	Il-hint'ekwilibrazzjoni	Il-hint'ekwilibrazzjoni	Il-hint'ekwilibrazzjoni	Il-hint'ekwilibrazzjoni
Wara l-aġitazzjoni u l-ċentrifugazzjoni						
IL-METODU INDIRETT						
Il-metodu parallel						
Il-korrezzjoni tal-fażi akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Il-metodu serjali						
Il-massa tas-sustanzi għat-test imkejla $f_{aliquot}^{vaA}$	$m_m^{ads}(t_i)$	μg				
IL-METODU DIRETT						
Il-massa tas-sustanza għat-test adsorbata fil-ħamrija	$m_s^{ads}(t_i)$	μg				
Il-kalkolu ta' l-adżorbzjoni						
L-adżorbzjoni	A_{t_i}	%				
	$A_{\Delta t_i}$	%				
Il-medji						
Il-koeffiċjent ta' l-adżorbzjoni	K_d	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$				
Il-medji						
Il-koeffiċjent ta' l-adżorbzjoni	K_{oc}	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$				
Il-medji						

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut ta' *dry mass* tal-ħamrija (105 °C, 12)

it-temperatura: °C

It-test ta' adżorbzjoni: l-imbjanki u l-kontroll

	Simb olu	Unita jiet	Imbjank	Imbjank	l-kontroll
In-nru tat-tubu					
Il-ħamrija miżuna		g			0 0
L-ammont ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (ikkalkulata)		cm^3			— —
Il-volum ta' 0,01 M CaCl_2 is-soluzzjoni miżjuda		cm^3			
Il-volum ta' l-istock <i>solution</i> tas-sustanza tat-test miżjuda		cm^3	0	0	
It-total tal-volum tal-fażi akwea (ikkalkulata)		cm^3			— —

▼B

	Simb olu	Unita jiet	Imbjank		Imbjank		l-kontroll	
Il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza għat-test fil-fażi akwea		$\mu\text{g cm}^{-3}$						

Wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni

Il-konċentrazzjoni fil-fażi akwea		$\mu\text{g cm}^{-3}$						

Rimarka: Żid il-kolonna jekk inhumehtieg

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

Il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija (105 °C 12 s): %

it-temperatura: °C

Il-bilanċ tal-massa

	simbolu	unitajiet				
Nru tat-tubu						
il-ħamrija miżuna	—	g				
Il-ħamrija: <i>dry mass</i>	m_{soil}	g				
il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kkalkulat)	V_{ws}	ml				
il-volum 0,01 M CaCl ₂ sol, biex tiġi ekwilibrazzjata l-ħamrija		ml				
Il-volum ta' <i>stock solution</i>		cm^3				
Il-volum totali tal-fażi akwea f'kuntatt mal-ħamrija	V_0	cm^3				
is-soluzzjoni inizjali tat-test tal-konċentrazzjoni	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni	—	h				

wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni

Il-korrezzjoni tal-fażi akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
il-ħin ta' ekwilibrazzjoni t	t_{eq}	h				

l-ewwel *dilution* bis-solvent

Il-volum imneħhi tal-fażi akwea	V_{rec}	cm^3				
Il-volum miżjud tas-solvent	ΔV	cm^3				

l-ewwel estrazzjoni bis-solvent

Is-sinjal analizzat fis-solvent	S_{E1}	var.				
konk. Sust. Għat-test. fis-solvent	C_{E1}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				

▼B

	simbolu	unitajiet				
Il-massa tas-sustanza meħuda mill-ħamrija u minn mal-ġnub tar-reċipjent	m_{E1}	μg				

It-tieni *dilution* bis-solvent

Il-volum imneħhi tas-solvent	ΔV_s	cm^3				
Il-volum miżjud tas-solvent	$\Delta V'$	cm^3				

It-tieni estrazzjoni bis-solvent

is-sinjal analizzat fil-fażi tas-solvent	S_{E2}	var.				
konk. test subst. in solvent	C_{E2}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
il-massa tas-sustanza meħuda mill-ħamrija u minn mar-reċipjent	m_{E2}	μg				
Il-massa totali tas-sust. għat-test. meħuda f'zewġ fażijiet	m_E	μg				
il-bilanċ tal-massa	MB	%				

Is-sustanza ttestjata:

Il-ħamrija ttestjata:

il-kontenut *dry mass* tal-ħamrija(105 °C, 12h): %

it-temperatura: °C

L-adżorbzjoni ta' l-isotermi

	simbolu	unitajiet								
Nru tat-tubu										
il-ħamrija miżuna	—	g								
Il-ħamrija: <i>dry mass</i>	E	g								
il-volum ta' l-ilma fil-ħamrija miżuna (kkalkulat)	V_{WS}	cm^3								
Il-volum 0,01 M CaCl_2 sol. Biex tiġi ekwilibrazzjata l-ħamrija		cm^3								
Il-volum ta' l- <i>istock solution</i> miżjud		cm^3								
Il-volum totali tal-fażi akwea f'kuntatt mal-ħamrija (calculated)	V_0	cm^3								
Soluzzjoni ta' konċentrazzjoni	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$								
il-hin ta' ekwilibrazzjoni	—	h								

▼B

	simbolu	unitajiet								
wara l-aġitazzjoni u ċ-ċentrifugazzjoni										
Il-korrezzjoni tal-fażi akwea imbjank tas-sustanza għat-test ta' konċentrazzjoni inkludiet	$C_{aq}^{ads} (eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
it-temperatura		$^{\circ}C$								
Il-massa ta' l-adzorbzjoni kull unità ta' hamrija	$C_s^{ads} (eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

L-analizi ta' rigressjoni:

valur ta' K_F^{ads} :

valur ta' $1/n$:

il-koeffiċjent tar-rigressjoni r^2 :

Is-sustanza ttestjata:

Il-hamrija ttestjata:

il-kontenut *dry mass* tal-hamrija (105 °C, 12 s): %

it-temperatura: °C

Il-metodologija analitika ta' wara: Indirett ☐ Parallel ☐ Serjali ☐

It-test ta' deżorbzjoni

	simbolu	unitajiet	Il-hint'ekw-ilibrazzjoni	Il-hint'ekw-ilibrazzjoni	Il-hint'ekw-ilibrazzjoni	Il-hint'ekw-ilibrazzjoni
Nru tat-tubu ġej mill-fażi ta' adzorbzjoni						
Il-massa tas-sustanza assorbita fuq il-hamrija f'ekwilibriju ta' adzorbzjoni	$m_s^{ads} (eq)$	μg				
Il-volum tal-fażi akwea mnehhija, rimpjazzat minn 0,01 M $CaCl_2$	V_R	cm^3				
Il-volum totali tal-fażi akwea F'kuntatt mal-hamrija	PM V_0 SM V_T	cm^3 cm^3				
Il-massa tas-sustanza għat-test imħollija fl-ekwilibriju ta' l-adzorbzjoni minhabba ir-rimpjazzament tal-volum inkomplut	m_{aq}^A	μg				

Il-kinetiċi tad-deżorbzjoni

Il-massa mkejla tas-sustanza disorbita mill hamrija fil-hin t_i	$m_m^{des} (t_i)$	μg				
Il-volum tas-soluzzjoni mehud mit-tubu (i) għal Il-kejl tas-sustanza għat-test	PM V_f^i	cm^3				
	SM V_a^D	cm^3				
Il-massa tas-sustanza disorbita mill-hamrija fil-hin t_i (ikkalkulat)	$m_{aq}^{des} (t_i)$	μg				
Il-massa tas-sustanza disorbita mill-hamrija il-hin ta' l-intervall Δt_i (ikkalkulat)	$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	μg				

▼B

	simbolu	unitajiet	Il- hint'ekw- ilibrazzj- oni	Il- hint'ekw- ilibrazzj- oni	Il- hint'ekw- ilibrazzj- oni	Il- hint'ekw- ilibrazzj- oni
Il-perċentwal tad-deżorbzjoni						
Id-deżorbzjoni fil-hin t_i	D_{t_i}	%				
Id-deżorbzjoni fl-intervall Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Il-koeffiċjent tad-deżorbzjoni apparenti	K_{des}					

MP: Il-metodu parallel

MS: Il-metodu serjali

▼B**C.19. ESTIMAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENT TA' ADSORPTION (K_{oc}) FUQ IL-HAMRIJA U FUQ HAMA TAD-DRENAĠĠ BL-UŻU TA' KROMATOGRAFIJA TA' LIKWIDU LI JIPPERFORMA GHOLI (HPLC)****1. METODU**

Dan il-metodu huwa replika tal-OECD TG121 (2001).

1.1. DAHLA

L-aġir ta' sorpzjoni tas-sustanzi fil-hamrija u fil-hama tad-drenaġġ jista' jkun deskritt permezz ta' parametri li jkunu determinati b'esperimentar permess tal-metodu tat-testjar C.18. Parametru importanti huwa l-koeffiċjent tal-assorbiment li huwa mfisser bhala r-ratio bejn il-koncentrazzjoni tas-sustanza fil-hamrija/hama u l-koncentrazzjoni tas-sustanza fil-faži akwatika fuq l-ekwilibriju tal-assorbiment. Il-koeffiċjent tal-assorbiment normalizzat għall-kontenut karboniku organiku fil-hamrija K_{oc} huwa indikatur utili għall-kapaċità vinkolanti ta' kimika fuq materja organika tal-hamrija jew hama tad-drenaġġ u jippermetti li wiehed jikkompara bejn kimiċi differenti. Dan il-parametru jista' jkun estimat minn korrelazzjonijiet mas-solubilità fl-ilma u in- n-octanol/koeffiċjenta' diviżjoni ta' l-ilma (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Il-metodu ta' esperimentar deskritt f'dan it-test juża' l-HPLC għall-estimu tal-koeffiċjent tal-assorbiment K_{oc} fil-hamrija u fil-hama tad-drenaġġ (8). L-estimi huma aktar ta' min wiehed jafdahom minn dawk tal-kalkolazzjoni QSAR (9). Bhala metodu ta' stima ma tistax tiehu post kompletament il-lott ta' esperimenti ta' ekwilibriju użati fil-metodu ta' test C18. Madankollu, il-K_{oc} estimata tista' tkun utili meta tiġl biex tagħzel paramentri ta' testijiet xierqa għal studji ta' assorbiment/desorpzjoni skond il-metodu ta' test C.18 billi tikkalkula l-K_d (koeffiċjent ta' distribuzzjoni) jew K_f (Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich) skond l-equation 3 (ara taqsim 1.2).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

K_d: Il-koeffiċjenti ta' distribuzzjoni huwa deskritt bhala r-ratio tal-koncentrazzjonijiet ta' ekwilibriju C ta' test fuq sustanza li kien imdewweb permezz ta' sistema ta' żewġ fażijiet li tikkonsisti f'sorbent (hamrija jew hama tad-drenaġġ) u faži akwatika; hija valur minghajr dimensjoni fejn koncentrazzjonijiet fiż-żewġ faži huma espressi skond bażi ta' piż/piż. Fil-każ illi l-koncentrazzjoni fil-faži akwatika hija mogħtija bhala bażi ta' piż/volum, hemmhakk il-units huma ml⁻¹. K_d tista' tvarja skond il-kwalitajiet ta' sorbent u tista' tkun dipendenti fuq is-solubilità.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ or } \frac{C_{slud}}{C_{aq}} \quad (1)$$

meta:

C_{soil} = koncentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-hamrija f ekwilibriju (µg· g⁻¹)

C_{slud} = koncentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-hama f ekwilibriju (µg· g⁻¹)

C_{aq} = koncentrazzjoni ta' sustanza taħt prova fil-faži akwatika fekwilibriju (µg· g⁻¹, µg· ml⁻¹).

▼B

K_f: Il-Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich konċentrazzjoni ta' sustanza taht prova fil-hamrija jew hama tad-drenaġġ (x/m) meta l-konċentrazzjoni tal-ekwilibriju C_{aq} fil-fażi akwatika hija ugwali għall-wiehed; units huma ng.g¹ sorbent. Il-valur jista' jvarja skond il-kwalitajiet tas-sorbent.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

fejn:

x/m = ammont ta' sustanza taht prova x (μg) assorbiti f' ammont ta' sorbent m (g) f'ekwilibriju

1/n = nizla ta' isotherm ta' assorbiment ta' Freundlich

C_{aq} = konċentrazzjoni ta' sustanza taht prova fil-fażi akwatika f'ekwilibriju (μg · ml⁻¹)

$$\text{At}C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Distribution coefficient (K_d) jew Koeffiċjent ta' assorbiment ta' Freundlich (K_f) normalizzat għall-kontenut ta' carbon organiku (f_{oc}) ta' sorbent; partikolarment għall-kimiċi li mhumiex ionizzata, huwa indikazzjoni approssimattiva għall-estent ta' assorbiment bejn is-sustanza u s-sorbent u jaċċetta li wiehed ikun jista' jikkompara bejn kimiċi different. Skond id-dimensjoni ta' K_d u K_f, K_{oc} tista' tkun minghajr dimensjoni jew ikollha l-units ml · g⁻¹ jew μg.g⁻¹ materja organika.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \left(\text{dimensionless or ml} \cdot \text{g}^{-1} \right) \text{ or } \frac{K_f}{f_{oc}} \left(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \right) \quad (3)$$

Ir-relazzjoni bejn K_{oc} u K_d mhijiex dejjem lineari u għalhekk valuri ta' K_{oc} jistghu jvarjaw minn hamrija għall-hamrija imma l-varjabilita' tista' tkun ridotta drastikament meta kkomparata ma' valuri K_d jew K_f.

Il-Koeffiċjent ta' assorbiment (K_{oc}) huwa mnaqqas mill-fattur ta' kapacita' (k') bl-użu ta' plot ta' kalibrazzjoni ta' log k' kontra log K_{oc} tat-tahlita magħżula bħala riferenza.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

fejn:

t_R = HPLC hin ta' ritenzjoni tat-test u sustanza ta' riferenza (minuti)

t₀ = HPLC hin mejjet (minuti) (ara taqsima 1.8.2).

P_{ow}: Il-koeffiċjenti tad-diviżjoni ta' octanol-ilma huwa deskritt bżala r-ratio tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza mdewba f'n-octanol u ilma; huwa valur minghajr dimensjoni.

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. SUSTANZI TA' RIFERENZA

Il-formula ta' struttura, il-purita' u l-konstant tad-dissoċjazzjoni (jekk mixtieqa) għandha tkun magħrufa qabel jintuża dan il-metodu. Informazzjoni dwar is-solubilita' fl-ilma u f'solventi organiċi, f'diviżjoni ta' koeffiċjenza ta' octanol-ilma u l-karatteristiċi ta' hydrolysis huma utili.

▼B

Sabiex tirrelata d-data ta' retezzjoni tal-HPLC kif imkejla ta' sustanza taht test bil-koeffiċjenti tal-assorbiment tagħha, graff ta' kalibrizzjoni ta' log K_{oc} kontra log k' għandha tkun stabbilita. Minimu ta' sitt punti ta' riferenza, mill-inqas wiehed 'il fuq u wiehed l-isfel mill-valur pretiż tas-sustanza taht prova għandhom ikunu użati. Ir-reqqa tal-metodu jkun aktar mtejjeb sinjifikament jekk ikunu wżati sustanzi ta' riferenza li huma relatati strutturalment mas-sustanza taht prova. Jekk din id-data mhijiex disponibbli, sta għall-utent illi jagħzel s-sustanzi ta' kalibrizzjoni xierqa. Sett aktar ġenerali ta' sustanzi strutturalment eteroġeniċi għandhom ikunu mghażula f'dan il-każ. Sustanzi u valuri ta' K_{oc} li jistgħu jkunu użati huma mnizzla fl-Anness f'Tabella 1 għall-hama ta' drenagg u f'Tabella 3 għall-hamrija. L-ghażla ta' sustanzi ohra ta' kalibrizzjoni għandha tkunu ġustifikati.

1.4. PRINĊIPJAL-METODU TA' PROVA

HPLC huwa magħmul fuq kolonni analitiċi ippakkjati b'fażi solida ta' cyanopropyl disponibbli kummerċjalment li fih jinstabu biċċiet ta' ipofiliċi u polari. Fażi stazzjonarja li hi moderalment polari bbażata fuq matrix ta' silica hija użata:

– O – Si	– CH ₂ – CH ₂ – CH ₂	– CN
silica	non-polar spacer	polar moiety

Il-prinċipju tal-metodu ta' prova huwa simili għall-metodu ta' testjar A.8 (koeffiċjent ta' diviżjoni, metodu HPLC). Waqt li tghaddi mill-kolonna flimkien mall-fażi mobbli, is-sustanza taht prova għandha effett mall-fażi stazzjonarja. Bħala riżultat diviżjoni o bejn fażijiet mobbli u stazzjonariju s-sustanza taht prova hija mdewwma. Iz-żewġ komposizzjonijiet tal-fażi stazzjonarja li għandhom sites polari u mhux polari jaċċettaw effett ma' gruppi polari u mhux polari ta' molekuli simili bħal fil-każ ta' materji organiċi f'matrices fil-hamrija jew fi hama tad-drenagg. Dan jagħmel possibbli r-relazzjoni bejn il-hin ta' ritenzjoni fil-kolonna u l-koeffiċjent ta' assorbiment f'materji organiċi li jista' jkun stabbilit.

pH għandu influwenza sinjifikattiva fuq l-atteggjament ta' sorpzjoni partikolarment f'sustanzi polari. Għall-hamrija agrikola jew tankijiet ta' impjanti ta' trattament ta' drenagg il-pH normalment tvarja bejn pH 5,5 u 7,5. Għal sustanzi ionizzabbli, żewġ testijiet għandhom ikunu magħmula b' formi kemm ionizzati u kemm mhux ionizzati f'soluzzjonijiet ta' buffer xierqa, imma dan biss f'każijiet fejn mill-inqas 10 % tal-kompost taht prova jkun dissoċjati bejn pH 5,5 u s-7,5.

Billi r-relazzjoni biss bejn ir-ritenzjoni fuq il-kolonna ta' HPLC u l-koeffiċjent ta' adzorbzjoni huwa użat għall-evalwazzjoni, mhux rikjest li jkun hemm il-metodu ta' analizzar kwantitattiv u jkun biss neċessarju d-determinazzjoni tal-hin ta' retention. Jekk ikun disponibbli sett ta' sustanzi ta' riferenza u jkunu jistgħu jiġu wżati kondizzjonijiet standard ta' esperimentar, il-metodu jipprovdi mezz aktar mghagħġla u effiċjenti sabiex ikun hemm estimu tal-koeffiċjent K_{oc} ta' assorbiment.

1.5. APPLIKABILITÀ TAT-TEST

Il-metodu HPLC huwa applikabbli għal sustanzi kimiċi (kemm jekk mingħajr tikketta u jekk bit-tikketta) għal xhiex sistema ta' skoperta xierqa (eż. spettrofotometer, ta' radjoattività) hija disponibbli u li huma suffiċjentament stabbli waqt il-lant tal-esperiment. Jista' jkun partikolarment bżonnjuż għall-kimiċi li huma diffiċli illi jkunu studjati f'sistemi ohra ta' esperimentar (i.e. sustanzi volatili; substanzji li ma jinhallux fl-ilma f'koncentrazzjoni illi tista' tiġi mkejla analitika; substanzji li għandhom affinita qawwija għas-surface tas-sistemi ta' inkubazzjoni). Il-metodu jista' jkun użat għat-tahlit illi jagħtu elution bands mhux risolti. F'każijiet bħal dawn, limiti 'l fuq u 'l isfel tal-valuri tal-log K_{oc} tal-kompost tat-tahlit taht prova għandhom ikunu magħrufa.

▼B

Xi kultant impuritajiet jistghu jikkawżaw problemi fl-interpretazzjoni tar-rizultati tal-HPLC, imma dawn huma ta' imprtanza minuri kemm-il darba s-sustanza taht prova tista' analitikament tkun identifikabbli kjarament u sseparata mill-impuritajiet.

Il-metodu huwa validat għal sustanzi mnizzla f'Tabella 1 fl-Anness u kien ukoll applikat għal varjeta ta' kimiċi oħra li jagħmlu parti mill-klassijiet ta' kimiċi kif ġejjin:

- amines aromatiċi (eż trifluralin, 4-chloroaniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naphthylamine),
- *carboxilic acid esters aromatic* (eż benzoic acid methylester, 3,5-dinitrobenzoic acid ethylester),
- hydrocarbons aromatiċi (eż toluene, xylene, ethylbenzene, nitrobenzene),
- aryloxyphenoxypropionic acid esters (eż *diclofop-methyl*, *fenoxaprop-ethyl*, *fenoxaprop-P-ethyl*),
- *benzimidazole* u *imidazole fungicides* (eż *carbendazim*, *fuveridazole*, *triazoxide*),
- *carboxilic acid amides* (eż *2-chlorobenzamide*, *N,N-dimethylbenzamide*, *3,5-dinitrobenzamide*, *N-methylbenzamide*, *2-nitrobenzamide*, *3-nitrobenzamide*),
- *chlorinated hydrocarbons* (eż *endosulfan*, *DDT*, *hexachlorobenzene*, *quintozene*, *1,2,3-trichlorobenzene*),
- *organophosphorus insecticides* (eż *azinphos-methyl*, *disulfoton*, *fenamiphos*, *isofenphos*, *pyrazophos*, *sulprofos*, *triazophos*),
- *phenols* (eż *phenol*, *2-nitrophenol*, *4-nitrophenol*, *pentachlorophenol*, *2,4,6-trichlorophenol*, *1-naphthol*),
- *phenylurea derivatives* (eż. *isoproturon*, *monolinuron*, *pencycuron*),
- *pigment dyestuffs* (eż *acid Yellow 219*, *Basic Blue 41*, *Direct Red 81*),
- *polyaromatic hydrocarbons* (eż *acenaphthene*, *naphthalene*),
- *1,3,5-triazine herbicides* (eż *prometryn*, *propazine*, *simazine*, *terbutryn*),
- *triazole derivatives* (eż *tebuconazole*, *triadimefon*, *tradimenol*, *triapenthenol*).

Il-metodu mhuwiex applikabbli għal sustanzi li jagħmlu reazzjoni jew mall-eluent jew mall-faži stazzjonarja. Mhuwiex applikabbli wkoll għal sustanzi illi jagħmlu reazzjoni b'mod speċifiku ma' tahlit inorganiku (eż formażżjoni ta' gzuz kumplessi ma' minerali taċ-ċaqquf). Il-metodu jista' ma jahdimx għal sustanzi attivi li jitiġħu fil-wieċ, kompost inorganiku u aċidi jew bażijiet moderati jew b'saħħithom. Valuri ta' Log K_{oc} bejn il-1,5 sal-5,0 jistghu jiġu ddeterminati. Sustanzi inonissabbli għandhom ikunu mkejla permezz ta' l-użu ta' fażi mmoħbli buffered, imma wie'ed għandu jieħu hsieb illi jevita l-precipitazzjoni ta' komponimenti ta' buffer jew sustanza taht prova.

▼B**1.6. KRITERJA TA' KWALITÀ'****1.6.1. Akkuratezza**

Normalment, il-koeffiċjent ta' assorbiment ta' sustanza taht prova jkun estimat bejn $\pm 0,5$ unit ta' log tal-valur determinat bil-metodu tal-ekwilibrju tal-grupp (ara Tabella 1 fl-Anness). Akkuratezza oghla tista' tiġi milhuqa jekk is-sustanza ta' riferenza użata hija strutturalment relatata mas-sustanza taht prova.

1.6.2. Ir-rata tar-repetizzjoni

Determinazzjonijiet għandhom isiru mill-inqas f'darbtejn. Il-valuri ta' log K_{oc} meħuda mill-kejl individwali għandu jkun bejn il-unit ta' 0,25 log.

1.6.3. Riproduċibbiltà

Esperjenza milhuqa sa issa fl-applikazzjoni tal-metodu hija ta' sosten għall-validità tagħha. Investigazzjoni tal-metodu ta' HPLC, bl-użu ta' 48 sustanza (l-aktar minnhom pestiċidi) għal liema kien hemm diġa disponibbli data dwar K_{oc} ta' min wiehed joqgħod fuqha tal-koeffiċjent ta' korrelazzjoni ta' $R = 0,95$ (10) (11).

Test ta' komparazzjoni magħmul f'laboratorju bil-partecipazzjoni ta' 11-il laboratorju ġie magħmul sabiex jirranġa u jivvalida il-metodu (12). Ir-riżultati huma mogħtija f'Tabella 2 fl-Anness.

1.7. DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' PROVA**1.7.1. Estimazzjoni preliminari tal-koeffiċjent ta' assorbiment**

Il-koeffiċjent P_{ow} ($= K_{ow}$) ta' diviżjoni ta' octanol-ilma u sa ċertu punt, is-solubilità fl-ilma jistgħu jintużaw bħala indikaturi ai fini tal-assorbiment, partikolarment għal sustanzi li mhumiex ionizzati, u għalhekk jistgħu jintużaw sabiex jinstab il-limitu preliminari. Varjeta' ta' korrelazzjonijiet b'żonnjużi ġew ippubblikati għall-diversi gruppi ta' kimiċi (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. Apparat

Kromatograf likwidu, li miegħu ġie mwahħal pompa pulse-free u mekkaniżmu xieraq ta' detection huwa meħtieġ. L-użu ta' valv ta' injezzjoni b'loop ta' injezzjoni huwa rikkmandat. Resins magħmula minn kimiċu ta' cyanopropyl magħquda kommerċjalment fuq bażi ta' silica għandhom ikunu użati (eż Hypersil u Zorbax CN). Kolonna ta' gwida ta' l-istess materjal tista' tkun impoġġija bejn is-sistema ta' injezzjoni u l-kolonna analitika. Kolonna minn fornituri differenti jistgħu jvarjaw konsiderevolment fl-effiċjenza tas-separazzjoni tagħhom. Bħala gwida, il-fatturi ta' kapaċità k' li ġejjin għandhom ikunu milhuqa: $\log k' > 0,0$ għal $\log K_{oc} = 3,0$ u $\log k' > 0,4$ għal $\log K_{oc} = 2,0$ meta tuża methanol/ilma 55/45 % bħala fażi mobbli.

1.7.3. Fażijiet mobbli

Diversi ġew ittestjati, u it-tnejn li ġejjin huma rrikmandati:

— methanol/ilma (55/45 % v/v),

— methanol/0,01M citrate-buffer pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

HPLC grade methanol u ilma distillat jew citrate buffer huma użati sabiex jiġi ppreparat is-solvent ta' elutar. It-tahlita hija iddigassjata qabel ma tiġi użata. Eluzzjoni isokratika għandha tkun użata. Jekk tahlit ta' methanol/ilma mhuwiex ritenut xieraq, tahlit organiku ieħor ta' other solvent/ilma jista' jiġi ppruvat, eż. ethanol/ilma jew tahlita ta' acetonitrile/ilma. Għal kompost ionizzabbli, l-użu ta' soluzzjoni ta' buffer hija rrikmandata sabiex tkun stabilizzata l-pH. Wiehed għandu jieh u hsieb illi tkun evitata preċipitazzjoni ta' melh u deterjorazzjoni ta' kolonni, li jista' jiġri waqt it-tahlit ta' xi phase/buffer organiċi.

L-ebda addittiv bħal reagents ta' ion pair jistgħu jiġu użati minhabba li dawn jistgħu jaffetwaw il-kwalifiki ta' sorpzjoni tal-fażi stazzjonarja. Dawn il-kambjamenti fil-fażi stazzjonarja jistgħu jkunu irriversibbli Għal din ir-raġuni, huwa obbligatorju illi esperimenti li fihom jintużaw addittivi għandhom isiru f'kolonni separati.

1.7.4. **Solutes**

Sustanzi taħt prova u ta' riferenza għandhom ikunu mahlulin fil-fażi mobbli.

1.8. **PRESTAZZJONI TAT-TEST**

1.8.1. **Il-kondizzjoni tat-test**

Waqt il-kejl it-temperatura għandha tkun irrekordjata. L-użu ta' kompartament ta' kolonna hija rrikmandata ħafna sabiex tigarantixxi kondizzjonijiet stabbli waqt il-kalibrazzjoni u r-runs ta' estimi u kejl tas-sustanza taħt prova.

1.8.2. **Determinazzjoni dead time to**

Għad-determinazzjoni tal-dead time għaż-żewġ metodi differenti jistgħu jiġu użati (ara wkoll taqsima 1.2).

1.8.2.1. *Determinazzjoni ta' hin mejjet permezz ta' serje omologi*

Din il-proċedura wriet illi tagħti valuri ta' min wiehed joqgħod fuqhom u li huma standard. Għad-detallji ara l-metodu tat-testjar A.8: koefiċjent ta' diviżjoni (n-octanol/ilma), metodu HPLC.

1.8.2.2. *Determinazzjoni ta' hin mejjet permezz ta' sustanzi inert li mhuviex miżmuma mill-kolonna*

Dan il-metodu ta' teknika huwa bbażat fuq injezzjoni ta' soluzzjonijiet ta' formamide, urea u nitrat tal-kubrit. Il-kejl irid ikun magħmul mill-inqas darbtejn.

1.8.3. **Determinazzjoni tad-drabi tar-ritenzjoni tR**

Sustanzi ta' riferenza għandhom ikunu magħzula kif deskritt f'taqsima 1.3. Jistgħu jkunu injettati bħala tahlita standard sabiex ikun stabbilit id-drabi tagħhom tar-ritenzjoni, kemm-il darba jkun ikkonfermat illi l-hin ta' ritenzjoni ta' kull standard ta' riferenza ma jkunx affetwat bil-preżenza ta' standards oħra ta' riferenza. Il-kalibrazzjoni għandha tkun magħmula f'intervalli regolari mill-inqas darbtejn kuljum sabiex jiehdu konsiderazzjoni ta' xi kambjamenti mhux maħsuba fil-kolonna tal-prestazzjoni. Għall-aħjar prattika, l-injezzjonijiet ta' kalibrazzjoni għandhom ikunu magħmula qabel u wara l-injezzjonijiet tas-sustanza taħt prova sabiex ikun ikkonfermat illi l-hin ta' ritenzjoni ma kienx injorat. Is-sustanzi taħt prova huma injettati separatament fi kwantitajiet kemm jista' jkun żgħir (sabiex jevitaw overload ta' kolonni) u l-hinijiet tagħhom ta' ritenzjoni jkunu determinati.

▼B

Sabiex tiżdied il-kunfidenza fil-kejl, mill-inqas żewġ determinazzjonijiet għandhom ikunu magħmula. Il-valuri ta' $\log K_{oc}$ migjuba mill-kejl individwali għandhom ikunu bejn $il-0,25 \log$ unit.

1.8.4. **Evalwazzjoni**

Il-fatturi ta' kapaċita' k' huma kkalkolati mill- h_{in} mejjet t_o u sal- h_{ini} jiet ta' ritenzjoni t_R tas-sustanzi tar-riferenza kif magħżula skond l-equation 4 (ara taqsima 1.2). Id-*data* tal-log k' tas-sustanzi ta' referenza huma mbagħad ipplottjati kontra il-valuri tal-log K_{oc} tagħhom mill-esperimenti ta' ekwilibriju fil-gruppi mogħtija f'Tabelli 1 u 3 tal-Anness. Bl-użu ta' dan il-plot, il-valur ta' log k' tas-sustanza taħt prova hija mbagħad użata sabiex ikun jista' jiġi stabbilit il-valur ta' log K_{oc} tagħha. Jekk ir-riżultati attwali juru illi l-log K_{oc} tas-sustanzi taħt prova hija barra l-limitu ta' kalibrazzjoni, it-test għandhu jerga jiġi magħmul bl-użu ta' sustanzi differenti, aktar xierqa.

2. **DATA U RRAPURTAR**

Ir-rapport għandu jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

- identita' tas-sustanzi taħt prova u bħala riferenza u l-purita tagħhom, u l-valuri pK_a jekk rilevanti,
- deskrizzjoni ta' apparat u kondizzjonijiet tal-operat eż. tip u dimensjoni tal-kolonna analitika (u gwida), il-metodu ta' identifikar, fażi mobbli (ratio ta' komponimenti u pH), il-limiti ta' temperatura waqt il-kejl,
- h_{in} mejjet u l-metodu użat sabiex ikun determinat,
- kwantitajiet ta' sustanzi taħt prova u bħala riferenza introdotti fil-kolonna,
- $h_{inijiet}$ ta' ritenzjoni tal-kompost ta' riferenza użat għall-kalibrazzjoni,
- dettalji tal-linja ta' rigressjoni kif mdahhla ($\log k'$ vs $\log K_{oc}$) u l-graff tal-linja ta' rigressjoni,
- medja tad-*data* ta' ritenzjoni u l-valur ta' $d \log K_{oc}$ estimat għall-kompost taħt prova.
- chromatograms.

3. **REFERENZI**

- (1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorbjoni coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. *Chemosphere*, 17, 1 67.
- (3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorbjoni, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *J. Agric. Food Chem.*, 29, pg. 1050-1059.
- (4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic between soil organic matter and water. *Sci. Technol.*, 17, pg. 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. *J. Sci. Health*, B19, pp. 297-312.

▼B

- (6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic, *Science*, 106, pg. 831-832.
- (7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, pg. 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35(1/2), pg. 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), pg. 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, *Chemosphere*, 27(12), pg. 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, *Chemosphere*, 22, pg. 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring. *Chemosphere*, 30(7), pg. 1373-1384.



ANNEX

Tabella 1

Komparazzjoni ta' valuri ta' Koc għall-hamrija u hama tad-drenaġġ, u valuri ikkalkolati bil-metodu tal-iscreening tal-HPLC ⁽¹⁾, ⁽²⁾

Sustanza	CAS Nr.	Log Koc drenaġ ġ hama	log Koc HPL C	Δ	log Koc hamri ja	log Koc HPL C	Δ
Atrazine	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Phenanthrene	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoic acid phenylester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniline	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

⁽¹⁾ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 – 128.

⁽²⁾ W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

Tabella 2

Riżultati ta' testijiet inter-komparabbli f'laboratorji (11 –il laboratorju parteċipanti) magħmula sabiex jagħmlu ahjar u jivvalidaw il-metodu ta' HPLC ⁽¹⁾

Sustanza	CAS Nr.	log K _{oc}	K _{oc} log	K _{oc}
		[OECD 106]	[Metodu HPLC]	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

⁽¹⁾ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.



Tabella 3

Sustanzi ta' riferenza rrikomandati għall-metodu tal-iscreening tal-HPLC ibbażat fuq id-data ta' assorbiment tal-hamrija

Sustanza ta' riferenza	CAS Nr.	Log K _{oc} mean valuri minn grupp ekwilibriju	Numru ta' data ta' K _{oc}	log S.D.	Ejghun
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Phenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N,N-dimethylbenzamide	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Methylbenzamide	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Methylbenzoate	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazine	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Aniline	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazophos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naphthalene	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Methiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Trichlorobenzene	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pyrazophos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Phenanthrene	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.

(c) Id-data provduta mill-industrija.

▼ **M7****C.20. TEST TAR-RIPRODUZZJONI DAPHNIA MAGNA****INTRODUZZJONI**

Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 211 tal-OECD (2012). Il-linji gwida tat-test tal-OECD jigu riveduti perijodikament fid-dawl tal-progress xjentifiku. Il-linja gwida tat-test 211 dwar ir-riproduzzjoni toriġina mil-linja gwida tat-test 202, Parti II, *Daphnia* sp. reproduction test (1984). Generalment kien rikonoxxut li dejta minn testijiet li jsiru skont dik it-TG 202 tista' tvarja. Dan wassal għal sforz konsiderevoli ddedikat għall-identifikazzjoni tar-raġunijiet għal din il-varjabbiltà bil-għan li jiġi prodott metodu ta' ttestjar aħjar. Il-linja gwida tat-test 211 hija msejsa fuq l-eżitu ta' dawn l-attivitajiet ta' riċerka, ringtests u studji ta' validazzjoni mwettqin fl-1992 (1), l-1994 (2) u l-2008 (3).

Id-differenzi ewlenin bejn il-verżjoni inizjali (TG 202, 1984), u t-tieni verżjoni (TG 211, 1998) tal-linja gwida tat-test dwar ir-riproduzzjoni huma:

- l-ispeċijiet rakkomandati sabiex jintużaw fid-*Daphnia magna*;
- id-durata tat-test hija ta' 21 jum.
- għal testijiet semistatiċi, in-numru ta' annimali li sejin jintużaw f'kull konċentrazzjoni tat-test tnaqqas minn tal-inqas 40, idealment maqsumin f'erba' gruppi ta' 10 annimali, għal tal-inqas 10 annimali miżmumin għalihom (għad li jistgħu jintużaw disinni differenti għal testijiet bi fluss kontinwu);
- saru rakkomandazzjonijiet iktar speċifiċi fir-rigward tal-medium tat-test u l-kundizzjonijiet tat-tagħlif.
- id-differenzi ewlenin bejn it-tieni verżjoni tal-linja gwida tat-test dwar ir-riproduzzjoni (TG 211, 1998), u din il-verżjoni huma:
- żdied l-Appendiċi 7 sabiex jiġu deskritti l-proċeduri għall-identifikazzjoni tas-sess tal-wild, jekk ikun hemm bżonn. B'konformità mal-verżjonijiet ta' qabel ta' dan il-metodu ta' ttestjar, il-proporzjon tas-sess huwa punt ta' tmiem fakultattiv;
- in-numru tal-varjabbli tar-rispons ta' nisel li jgħix prodott għal kull annimal ġenitur li jibqa' haj ġie ssupplimentat minn varjabbli tar-rispons addizzjonali għar-riproduzzjoni ta' *Daphnia*, jiġifieri n-numru totali ta' nisel haj prodott fi tmiem it-tst għal kull daphnia ġenitur fil-bidu tat-test, eskluż mill-analiżi tal-mortalità aċċidentali u/jew mhux intenzjonata tal-ġenituri. L-iskop tal-varjabbli tar-rispons miżjud huwa li dan il-varjabbli tar-rispons jiġi allinjat ma' metodi ta' ttestjar tar-riproduzzjoni oħrajn fuq l-invertebrati. Barra minn hekk, b'rabta ma' dan il-varjabbli tar-rispons, f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa possibbli li jitneħħa sors ta' żball, jiġifieri l-effett ta' mortalità mhux intenzjonata u/jew aċċidentali tal-ġenituri, jekk isehh matul il-perjodu ta' esponiment.
- gwida statistika addizzjonali għad-disinn tat-test u għat-trattament tar-riżultati ġiet inkluża kemm għall-EC_x (eż. EC10 jew EC50) kif ukoll għall-approċċ NOEC/LOEC.
- huwa introdott test tal-limitu.

Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

L-għan primarju tat-test huwa li jiġi vvalutat l-effett tal-kimiku fuq ir-riżultat riproduttiv tad-*Daphnia magna*. Għal dan il-għan, *Daphnia* femminili żgħar (l-annimali ġenituri), li jkollhom inqas minn 24 siegħa fil-bidu tat-test, jigu esposti għas-sustanza kimika tat-test miżjuda mal-ilma f'medda ta' konċentrazzjonijiet. Id-durata tat-test hija ta' 21 jum. Fi tmiem it-test jiġi vvalutat in-numru totali ta' nisel haj prodott. Ir-riżultat riproduttiv tal-annimali ġenituri jista' jkun espress permezz ta' modi oħrajn (eż. numru ta' nisel haj prodott minn kull annimal kull jum mill-ewwel ġurnata li fih beda jiġi osservat in-nisel) iżda dan għandu jiġi rrapportat minbarra n-nisel haj prodott fi tmiem it-test. Minhabba d-disinn partikolari tat-test semistatiku meta mqabbel ma' metodi ta' ttestjar oħrajn tar-riproduzzjoni tal-invertebrati, huwa possibbli wkoll li jingħadd in-numru ta' nisel haj

▼ M7

prodott minn kull annimal ġenitur individwali. Dan jippermetti sabiex, għall-kuntrarju ta' metodi oħrajn ta' ttestjar tar-riproduzzjoni fl-invertebrati, jekk l-annimal ġenitur imut b'mod aċċidentali u/jew b'mod mhux intenzjonat, il-produzzjoni ta' nisel tiegħu tista' tiġi eskluża mill-valutazzjoni tad-dejta. B'hekk, jekk issehh mortalità tal-ġenituri f'repliki esposti, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-mortalità ssegwix mudell ta' rispons għall-konċentrazzjoni, eż. jekk hemmx rigressjoni sinifikanti tar-rispons kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test b'pendil pozittiv (għal dan jista' jintuża test statistiku bħat-test tat-tendenza ta' Cochran-Armitage). Jekk il-mortalità ma ssegwix xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, dawk ir-repliki b'mortalità tal-ġenituri għandhom jiġu esklużi mill-analizi tar-riżultat tat-test. Jekk il-mortalità ssegwi xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, il-mortalità tal-ġenituri għandha tiġi assenjata bħala effett tas-sustanza kimika tat-test u r-repliki ma għandhomx jiġu esklużi mill-analizi. Jekk l-annimal ġenitur imut matul it-test, jiġifieri aċċidentalment minhabba mmanigġjar hażin jew aċċident, jew b'mod mhux intenzjonat minhabba l-inċident mhux spjegat mhux marbut mal-effett tas-sustanza kimika tat-test jew jirriżulta li huwa raġel, ir-replika tiġi eskluża mill-analizi (ara iktar fil-paragrafu 51). L-effett tossiku tas-sustanza kimika tat-test fuq l-eżitu riproduttiv jingħata bħala EC_x billi d-dejta titqiegħed f'mudell xieraq permezz ta' rigressjoni mhux lineari sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaguna tnaqqis ta' x % fl-eżitu riproduttiv, rispettivament, jew inkella bħala l-valur NOEC/LOEC (4). *Idealment, il-konċentrazzjonijiet tat-test jiġbru l-inqas mill-konċentrazzjonijiet tal-effett użati (eż. EC_{10}) xi haġa li tfisser li dan il-valur huwa kkalkolat b'interpolazzjoni u mhux estrapolazzjoni.*

Is-sopravvivenza tal-annimali ġenituri u ż-żmien sal-produzzjoni tal-ewwel ħut riproduttur għandu jkun irrapportat ukoll. Effetti oħrajn marbutin mas-sustanza kimika fuq parametri bħat-tkabbir (eż. it-tul), u r-rata possibbilment intrinsika taż-żieda fil-popolazzjoni, jistgħu jiġu eżaminati wkoll (ara l-paragrafu 44).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

Ir-riżultati ta' test tat-tossicità akuta (ara l-kapitolu C.2 ta' dan l-Anness: Test tal-immobilizzazzjoni akuta ta' *Daphnia* sp.) imwettaq b'*Daphnia* magna jista' jkun utli fl-għażla ta' medda xierqa ta' konċentrazzjonijiet tat-test fit-testijiet tar-riproduzzjoni. Is-solubilità fl-ilma u l-pessjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandhom ikunu magħrufin u għandu jkun hemm disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fis-soluzzjonijiet tat-test b'effiċjenza ta' rkupru rrapportata u l-limitu ta' determinazzjoni.

Informazzjoni fuq is-sustanza kimika tat-test, li tista' tkun siewja sabiex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test, tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza kimika, l-istabilità fil-kundizzjonijiet tat-test, il-pKa, P_{OW} u riżultati ta' test għall-bijodegradabilità faċli (ara l-kapitolu C.4 (determinazzjoni ta' bijodegradabilità "faċli") u C.29 (bijodegradabilità faċli — CO_2 freċċipjenti ssigillati) ta' dan l-Anness).

VALIDITÀ TAT-TEST

Sabiex test ikun validu, dawn il-kriterji ta' eżekuzzjoni li ġejjin, għandhom ikunu ssodisfati fil-kontroll(i):

- il-mortalità tal-annimali ġenituri (*Daphnia* femminili) ma taqbiżx 1-20 % fi tmiem it-test;
- in-numru medju ta' nisel haġ prodott għal kull annimal ġenitur li jibqa' haġ fi tmiem it-test huwa ta' > 60 .

Nota: Jista' jintuża l-istess kriterju ta' validità (20 %) għal mortalità aċċidentali u mhux intenzjonata tal-ġenituri għall-kontrolli kif ukoll għal kull wahda mill-konċentrazzjonijiet tat-test.

▼ **M7****DESKRIZZJONI TAL-METODU****Apparat**

Ir-riċipjenti tat-test u apparat iehor li se jrin jiġu f'kuntatt mas-soluzzjonijiet tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimika-ment inerti iehor. Normalment ir-riċipjenti tat-test ikunu bekkijiet tal-ħġieġ.

Barra minn hekk, huma meħtieġa whud jew kull wieħed mill-apparati ta' hawn taħt:

- ossiġenometru (b'mikroelektrodu jew apparat xieraq iehor għall-kejl tal-ossiġenu dissolt f'kampjuni ta' volum baxx);
- apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura;
- miter tal-pH;
- apparat għad-determinazzjoni tal-ebusija tal-ilma;
- apparat għad-determinazzjoni tal-konċentrazzjoni ta' karbonju organiku totali (TOC) tal-ilma jew apparat għad-determinazzjoni tad-domanda kimika ta' ossiġenu (COD),
- apparat adegwat għall-kontroll tar-reġim tad-dawl u l-kejl tal-intensità tad-dawl.

Organizmu tat-Test

L-ispeċi li għandha tintuża fit-test hija *Daphnia magna* Straus ⁽¹⁾.

Idealment, il-klonu għandu jkun ġie identifikat bil-ġenotipar. Riċerka (1) uriet li l-prestazzjoni riproduttiva tal-Klonu A (li oriġina minn IRCHA fi Franza) (5) konsistentament lahaq il-kriterju ta' validità ta' medja ta' ≥ 60 nisel ħaj kull annimal ġenitur li jkun baqa' ħaj meta kkulturati fil-kundizzjonijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. Madankollu, kloni oħrajn jistgħu jiġu aċċettati diment li jintwera li l-kultura tad-*Daphnia* tilhaq il-kriterji ta' validità għat-test.

Fil-bidu tat-test, l-annimali għandu jkollhom inqas minn 24 siegħa u ma għandhomx l-ewwel wild tad-duqqajs. Għandhom ikunu derivati minn stokk b'saħħtu (jiġifieri ma juri l-ebda sinjal ta' stress bhall-mortalità għolja, il-preżenza ta' maskili u efpjja, dewmien fil-produzzjoni tal-ewwel duqqajs, annimali skuluriti, eċċ.). L-annimali tal-istokk għandhom jinżammu f'kundizzjonijiet tal-kultura (dawl, temperatura, medium, għalf u annimali għall-kull unità ta' volum) simili għal dawk użati fit-test. Jekk il-medium tal-kultura ta' *Daphnia* li jkun sejjer jintuża fit-test huwa differenti minn dak użat għall-kultura tas-soltu ta' *Daphnia*, hija Prattika tajba li jkun inkluz perjodu ta' akklimatizzazzjoni ta' qabel it-test li normalment jiehu 3 ġimgħat (jiġifieri generazzjoni waħda) sabiex ikun evitat stress fuq l-annimali ġenituri.

Medium tat-test

Huwa rakkomandat li jintuża medium li huwa kompletament definit f'dan it-test. Dan jista' jevita l-użu ta' addittivi (eż. alga, estratt tal-hamrija), li diffiċli jiġu kkaratterizzati, u għalhekk itejjeb l-oportunitajiet għall-istandardizzar bejn il-laboratoġi. Instab li media Elendt M4 (6) u M7 (ara l-Appendiċi 2) huma adegwati għal dan il-ghan. Madankollu, media oħrajn (eż. (7) (8)) huma aċċettabbli diment li jintwera li l-prestazzjoni tal-kultura ta' *Daphnia* tissodisfa l-kriteji ta' validità għat-test.

⁽¹⁾ Jistgħu jintużaw dafnidi oħrajn diment li dawn jissodisfaw il-kriterji ta' validità kif xieraq (il-kriterju ta' validità relatat mall-eżitu riproduttiv fil-kontrolli għandu jkun rilevanti għall-ispeċijiet kollha). Jekk jintużaw dafnidi oħrajn, dawn għandhom ikunu identifikati biċ-car u jrid jiġi ġġustifikat l-użu tagħhom.

▼ **M7**

Jekk jintużaw media li jinkludu addittivi li mhumiex definiti, dawn l-addittivi għandhom ikunu speċifikati ċari u l-informazzjoni għandha tkun ipprovduta fir-rapport tat-test dwar il-kompożizzjoni, partikolarment fir-rigward tal-kontenut ta' karbonju għaliex dan jista' jikkontribwixxi għad-dieta stipulata. Huwa rakkomandat li jiġi ddeterminat il-karbonju organiku totali (TOC) u/jew id-domanda kimika ta' ossiġenu (COD) tal-preparazzjoni tal-istokk tal-addittiv organiku u li ssir stima tal-kontribuzzjoni li tirriżulta tal-TOC/COD fil-medium tat-test. Huwa rakkomandat ukoll li l-livelli ta' TOC fil-medium (jiġifieri qabel iż-żieda tal-algi) ikunu inqas minn 2 mg/l (9).

Meta jkunu qeghdin jiġu ttestjati sustanzi kimiċi li fihom hemm metalli, huwa importanti li wiehed jirrikonoxxi li l-medium tat-test (eż. ebusija, kapacità kelanti) jista' jkollu impatt fuq it-tossicità tas-sustanza kimika tat-test. Għal din ir-raġuni, idealment jintuża medium kompletament definit. Madankollu, bħalissa, l-uniċi media li huma definiti kompletament magħrufin bħala adegwati għall-kultura fit-tul ta' *Daphnia magna* huma Elendt M4 u M7. Iz-żewġ media fihom l-aġent kelanti EDTA. Ix-xogħol wera (2) illi t-“tossicità apparenti” tal-kadmju hija generalment inqas meta t-test tar-riproduzzjoni isir fil-media M4 u M7 milli meta kienu fil-media li ma kienx fihom EDTA. Għalhekk, M4 u M7 mhumiex irrakkomandati għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi li fihom metalli, u media oħrajn magħrufin li fihom aġenti kelanti għandhom ikunu evitati wkoll. Għal sustanzi kimiċi li fihom il-metall, jista' jkun rakkomandat li jintuża medium iehor bħal, pereżempju ilma helu iebes rikostitwit tal-ASTM (9), li ma fih ebda EDTA. Dan it-tahlita ta' ilma helu iebes rikostitwit tal-ASTM u estratt tal-alga (10) hija xierqa għall-kultura fit-tul ta' *Daphnia magna* (2).

Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun oghla minn 3 mg/l fil-bidu u matul it-test. Il-pH għandha tkun bejn 6 — 9, u normalment m'għandhiex tvarja b'aktar minn 1.5 unitajiet f'test wiehed. Hija rakkomandata ebusija 'il fuq minn 140 mg/l (bħal CaCO_3). Testijiet f'dan il-livell u iktar urew prestazzjoni riproduttiva konformi mal-kriteji ta' validità (11) (12).

Soluzzjonijiet tat-test

Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin normalment jithejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Idealment, is-soluzzjonijiet ewlenin għandhom jiġu ppreparati, mingħajr ma jintuża ebda solvent jew aġent dispersiv, permezz ta' thallit jew theżżiż tas-sustanza kimika tat-test fil-medium tat-test bl-użu ta' mezza mekkaniċi bħat-theżiż, it-thawwid jew l-ultrasonikazzjoni, jew metodi xierqa oħrajn. Idealment is-sistemi tat-test jiġu esposti għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test li sejrin jintużaw fl-istudju għat-tul ta' żmien methieġ sabiex tintwera z-żamma ta' konċentrazzjonijiet tal-esponiment stabbli qabel l-introduzzjoni tal-organiżmi tat-test. Jekk is-sustanza kimika tat-test diffiċli biex tiġi dissolta fl-ilma, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri deskritti fil-Gwida tal-OECD għall-immaniġġjar ta' sustanzi diffiċli (13). L-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi għandu jiġi evitat iżda jista' jkun mehtieġ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif suppost għad-dożaġġ.

Kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni b'repliki adegwati u, jekk dan ma jkunx evitabbli, kontroll tas-solvent b'repliki adegwati għandu jintuża minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Fit-test għandhom jintużaw solventi jew aġenti dispersivi biss li ġew investigati li ma għandhomx effetti sinifikanti jew minimi biss fuq il-varjabbli tar-rispons. Eżempji ta' solventi xierqa (eż. acetone, etanol, metanol,

▼ **M7**

dimetilformammid u glikol tat-trietilen) u aġenti dispersivi (eż. Cremophor RH40, metilċelluloża 0.01 % u HCO-40) jingħataw fi (13). Meta jintuża solvent jew aġent dispersiv, il-konċentrazzjoni finali tiegħu ma għandhiex tkun ikbar minn 0.1 ml/l (13) u għandha tkun l-istess konċentrazzjoni fir-reċipjenti kollha tat-test, hlief il-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Madankollu, għandu jsir kull sforz biex il-konċentrazzjoni tas-solvent tinżamm għall-minimu possibbli.

PROCEDURA**Kundizzjonijiet tal-Esponiment***Durata*

Id-durata tat-test hija ta' 21 jum.

Tagħbija

L-annimali ġenituri jinżammu għalihom, wiehed għal kull reċipjent tat-test, normalment b'50 — 100 ml (għal *Daphnia magna*, jistgħu jkunu possibbli volummi iżgħar, speċjalment għal dafnidi iżgħar eż. *Ceriodaphnia dubia*) ta' medium f'kull reċipjent, sakemm ma jkunx hemm bżonn ta' disinn tat-test bi fluss kontinwu għall-ittestjar.

Kultant jista' jkun hemm bżonn ta' volumi akbar sabiex jintlaħqu r-rekwiżiti tal-proċedura analitika użata sabiex tkun determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, għalkemm ir-raggruppament tar-repliki għall-analizi kimika huwa permess ukoll. Jekk jintużaw volumi akbar minn 100 ml, il-porzjon mogħtija lid-*Daphnia* jaf ikollha bżonn li tiżdied sabiex ikun żgurat li jkun hemm provvista adegwata tal-ikel u konformità mall-kriterji tal-validità.

L-annimali tat-test

Għat-testijiet semistatiċi, tal-inqas 10 annimali mizmuma individwalment f'kull konċentrazzjoni tat-test u tal-inqas 10 annimali mizmuma individwalment f'serje tal-kontrolli.

Għal testijiet bi fluss kontinwu, intwera li 40 animal maqsuma f'erba' gruppi ta' 10 annimali f'kull konċentrazzjoni tat-test huma adegwati (1). Huwa rakkomandat li jintuża numru iżgħar ta' organiżmi tat-test u tal-inqas 20 animal għal kull konċentrazzjoni maqsuma f'żewġ repliki jew iktar bl-istess numru ta' annimali (eż. erba' repliki kull wiehed b'hames dafnidi). Kun af li għal testijiet li fihom l-annimali jinżammu fil-gruppi, mhuwiex sejjer ikun possibbli li jiġi eskluż kwalunkwe nisel mill-analizi statistika jekk issehh mortalità mhux intenzjonata/aċċidentali tal-ġenitur meta tkun bdiet ir-riproduzzjoni, u b'hekk f'dawn il-każijiet l-eżitu riproduttiv għandu jiġi espress b'hala n-numru totali ta' nisel haġ prodott għal kull ġenitur preżenti fil-bidu tat-test.

It-trattamenti għandhom ikunu allokat i għar-reċipjenti tat-test u kull immanigġjar sussegwenti tar-reċipjenti tat-test għandhom isiru b'mod aleatorju. Nuqqas milli jsir hekk jista' jirriżulta fi preġudizzju li jista' jittiehed b'hala effett ta' konċentrazzjoni. B'mod partikolari, jekk unitajiet esperimentali jiġu mmanigġjati f'ordni tat-trattament jew tal-konċentrazzjoni, jiġri li xi effetti relatati mal-hin, bħall-gheja tal-operatur jew xi żball ieħor, jista' jwassal għall-effetti akbar f'konċentrazzjonijiet oġġla. Barra minn hekk, jekk ir-riżultati tat-test aktarx li sejr in ikunu affettwati minn kundizzjoni inizjali jew ambjentali tat-test, bħall-posizzjoni fil-laboratorju, għandu jiġi kkunsidrat l-imblokkar tat-test.

Għalf

Għal testijiet semistatiċi, idealment it-tagħlif għandu jsir kulljum, izda mill-inqas tliet darbiet fil-gimġha (jiġifieri li jikkorrispondi għall-bidliet fil-media). Id-dilwizzjoni possibbli tal-konċentrazzjonijiet tal-esponiment b'żieda tal-ikel għandha tiġi kkunsidrata u evitata kemm jista' jkun b'sospensjonijiet tal-alga kkonċentrat i sew. Għandhom ikunu rrapportati devjazzjonijiet minn dan (eż. għal testijiet bi fluss kontinwu).

Waqt it-test, idealment, id-dieta tal-annimali ġenituri għandha tkun ċelloli ta' algi haġjin ta' waħda jew aktar minn dawn li ġejjin: *Chlorella sp.*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (qabel kienet imsejha *Selenastrum capricornutum*) u *Desmodesmus subspicatus* (qabel kienet imsejha *Scenedesmus subspicatus*). Id-dieta mogħtija għandha tkun ibbażata fuq l-ammont ta' karbonju organiku (C) ipprovduta f'kull animal ġenitur. Ir-riċerka (14) uriet li, għal *Daphnia magna*, livelli ta' porzjon

▼ **M7**

ta' bejn 0.1 u 0.2 mg C/*Daphnia*/jum huma biżżejjed sabiex jintlaħaq in-numru mitlub ta' nisel ħaj sabiex jintlaħaq il-kriteju ta' validità tat-test. Il-porzjon tista' tkun fornita frata kostanti matul il-perjodu tat-test, jew, jekk mixtieg, tista' tintuża rata aktar baxxa fil-bidu u mbagħad tiżdied matul it-test sabiex jittiehed f'kunsiderazzjoni t-kabbir tal-annimali ġenituri. F'dan il-każ, il-porzjon xorta għandha tibqa' fil-medda rakkomandata ta' 0.1 — 0.2 mg C/*Daphnia*/jum f'kull ħin.

Jekk jintużaw miżuri surrogati, bħan-numru ta' ċelloli ta' algi jew l-assorbiment tad-dawl, sabiex jingħataw il-livell mehtieg ta' porzjon (jiġifieri għall-konvenzja minhabba li l-kejl tal-kontenut ta' karbonju jiehu l-ħin), kull laboratorju għandu jipproduċi n-nomograff proprju tiegħu relatat mal-miżura sostituta tal-kontenut ta' karbonju tal-kulturi ta' algi (ara l-Appendiċi 3 għal pariri dwar il-produzzjoni ta' nomograff). In-nomografi għandhom ikunu vverifikati mill-inqas kull sena jew aktar jekk jinbidlu l-kundizzjonijiet tal-kultura tal-algi. Instab li l-assorbiment tad-dawl huwa surrogat aħjar għall-kontenut ta' karbonju milli numru ta' ċelloli (15).

Għandha tingħata sospensjoni ta' alga kkonċentrata lid-*Daphnia* sabiex jitnaqqas il-volum ta' medium tal-kultura ta' algi ttrasferit fir-riċipjenti tat-test. Il-koncentrazzjoni tal-algi tista' tinkiseb b'ċentrifugazzjoni segwita mir-risospensjoni fil-medium tal-kultura ta' *Daphnia*.

Dawl

16-il siegħa dawl f'intensità li ma taqbiżx il-15-20 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ imkejla fil-wieċ tal-ilma tar-riċipjent. Għal strumenti li jkejlu d-dawl ikkalibrati f'lux, medda ekwivalenti ta' 1 000 — 1 500 lux għal dawl abjad bati tikkorrispondi bejn wieħed u iehor għall-intensità ta' dawl rakkomandata ta' 15-20 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Temperatura

It-temperatura tal-media tat-test għandha tkun fi hdan il-medda ta' 18-22 °C. Madankollu, għal kull test, it-temperatura ma għandhiex tvarja, kemm jista' jkun possibbli, b'aktar minn 2 °C bejn dawn il-limiti (eż. 18-20, 19-21 jew 20-22 °C) bħala medda ta' kuljum. Jista' ikun xieraq li jintuża riċipjent tat-test iehor għall-fini ta' monitoraġġ tat-temperatura.

Ossigenazzjoni

Ir-riċipjenti tat-test ma għandhomx jiġu ossiġenati matul it-test.

Disinn tat-test*Test tas-sejbien tal-medda*

Meta jkun hemm bżonn, isir test tas-sejbien tal-medda, pereżempju b'ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u żewġ repliki għal kull trattament u kontroll. Informazzjoni addizzjonali, minn testijiet b'sustanzi kimiċi simili jew minn tagħrif, dwar it-tossiċità akuta għad-*Daphnia* u/jew organiżmi akkwatiċi oħrajn, tista' tkun siewja wkoll meta tittiehed deċiżjoni fuq il-medda ta' konċentrazzjonijiet li ser jintużaw fit-test tas-sejbien tal-medda.

Id-durata tat-test tas-sejbien tal-medda hija ta' 21 jum jew durata twila biżżejjed sabiex ikunu jistgħu jtbassru b'mod affidabbli l-livelli tal-effetti. Fi tmiem it-test tiġi vvalutata r-riproduzzjoni tad-*Daphnia*. Għandhom jiġu rreġistrati n-numru ta' ġenituri u l-okkorrenza ta' nisel.

Test definittiv

Normalment għandu jkun hemm tal-inqas ħames konċentrazzjonijiet tat-test, li jkopru l-konċentrazzjoni effettiva (eż. EC₅₀), u dawn għandhom ikunu rrangati f'serje ġeometrika b'fattur ta' separazzjoni li idealment ma jaqbiżx it-3.2 Għandu jintuża numru xieraq ta' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test (ara l-paragrafi 24-25). Għandha tingħata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn ħames

▼M7

konċentrazzjonijiet. Is-sustanzi kimiċi ma għandhomx ikunu ittestjati 'il fuq mill-limitu ta' solubilità tagħhom fil-medium tat-test. Qabel ma jsir l-esperiment, huwa rakkomandat li tiġi kkunsidrata s-saħha statistika tad-disinn tat-testijiet u li jintużaw metodi statistiċi xierqa (4). Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wiehed għandu jżomm f'moħħu dan li ġej:

- (i) Jekk tiġi stmata l-EC_x għall-effetti fuq ir-riproduzzjoni, huwa rakkomandatli jintużaw konċentrazzjonijiet għoljin biżżejjed sabiex tiġi definita l-EC_x b'livell xieraq ta' kunfidenza. Idealment, il-konċentrazzjonijiet tat-test użati għandhom ikopru l-EC_x stmata b'tali mod li l-EC_x tinstab b'interpolazzjoni minflok estrapolazzjoni. Huwa vantaġġ għall-analiżi statistika li ġejja li jintużaw iktar konċentrazzjonijiet tat-test (eż. 10) u inqas repliki f'kull konċentrazzjoni (eż. 5 b'hekk jinżamm in-numru totali ta' kostant tar-riċipjenti) u b'10 kontrolli.
- (ii) Meta tiġi stmata l-LOEC u/jew l-NOEC, l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex b'hekk l-eżitu riproduttiv f'dik il-konċentrazzjoni ma jkunx sinifikatament inqas minn dak tal-kontroll. Jekk dan mhuwiex il-każ, it-test għandu jkun ripetut bl-inqas konċentrazzjoni mnaqqa.
- (iii) Meta tiġi stmata l-LOEC u/jew l-NOEC, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed sabiex b'hekk l-eżitu riproduttiv f'dik il-konċentrazzjoni jkun sinifikatament inqas minn dak tal-kontroll. Jekk dan ma jkunx il-każ, it-test għandu jiġi ripetut bl-ogħla konċentrazzjoni miżjuda sakemm ma tintużax il-konċentrazzjoni tat-test massima meħtieġa għall-ittestjar tal-effetti kroniċi (jiġifieri 10 mg/l) bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test fit-test inizjali.

Jekk ma jiġi osservat ebda effett fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejbien tal-medda (eż. f'10 mg/l), jew meta s-sustanza kimika tat-test jkollha probabilità għolja li tkun baxxa/ ebda tossiċità fuq il-bażi tat-tossiċità għal organiżmi oħrajn u/jew ebda tehid/tehid baxx, it-test tar-riproduzzjoni jista' jsir bħala test tal-limitu, bl-użu ta' konċentrazzjoni tat-test ta' eż. 10 mg/l u l-kontroll. Għandhom jintużaw għaxar repliki kemm għall-grupp tat-trattament kif ukoll tal-kontroll. Meta jista' jkollu bżonn isir test tal-limitu f'sistema bi fluxs kontinwu, ikun biżżejjed li jintgħazlu inqas repliki. Test tal-limitu sejjer jipprovi l-opportunità li jintwera li ma hemm ebda effett statistikament sinifikanti fil-konċentrazzjoni ta' limitu, iżda jekk jiġu rreġistrati effetti, normalment ikun hemm bżonn li jsir test shih.

Kontrolli

Minbarra s-serje tat-test, għandha ssir ukoll serje waħda tal-kontroll tal-medium tat-test u, jekk rilevanti, serje waħda tal-kontroll li fiha s-solvent jew l-aġent dispersiv. Meta tintuża, il-konċentrazzjoni tas-solvent jew tal-aġent dispersiv għandha tkun l-istess bħal dik użata fir-riċipjenti li fihom is-sustanza kimika tat-test. Għandu jintuża n-numru xieraq ta' repliki (ara l-paragrafi 23-24).

Ġeneralment, f'test magħmul tajjeb, il-koeffiċjent ta' varjazzjoni madwar in-numru medju ta' nisel ha'j prodott għal kull annimal ġenitur fil-kontroll(i) għandu jkun ta' ≤ 25 %, u dan għandu jkun irrapportat għad-disinn tat-test bl-użu ta' annimali miżmumin individwalment.

Tigdid tal-medium tat-test

Il-frekwenza tat-tigdid tal-medium tiddependi mill-istabilità tas-sustanza kimika tat-test, iżda għandha tkun mill-inqas ta' tliet darbiet fil-ġimgħa. Jekk, mit-testijiet preliminari tal-istabilità (ara l-paragrafu 7) il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx stabbli (jiġifieri barra l-medda ta' 80 — 120 % tal-valur nominali jew li taq' taht it-80 % tal-konċentrazzjoni inizjali mkejla) fuq il-perjodu massimu ta' tigdid (jiġifieri 3 ijiem), wiehed għandu jiehu f'kunsiderazzjoni it-tigdid iktar spiss tal-medium, jew l-użu ta' test bi fluxs kontinwu.

▼ **M7**

Meta l-medium jiġgedded f'testijiet semistatiċi, tithejja t-tieni sensiela ta' reċipjenti tat-test u l-annimali ġenituri jiġu ttrasferiti fihom, pereżempju, b'pipetta tal-ħgieġ b'dijametru xieraq. Il-volum ta' medium ittrasferit bid-*Daphnia* għandu jkun minimizzat.

Osservazzjonijiet

Ir-riżultati tal-osservazzjonijiet li jsiru matul it-test għandhom jiġu rreġistrati fuq skedi ta' deġta (ara l-eżempji fl-Appendiċijiet 4 u 5). Jekk ikunu meħtieġa miżuri oħrajn (ara l-paragrafu 44), jista' jkun hemm bżonn ta' osservazzjonijiet addizzjonali.

Nisel

In-nisel prodott minn kull annimal ġenitur idealment għandu jitneħħa u jingħadd ta' kuljum mid-dehra tal-ewwel duqqajs sabiex jiġi evitat milli dawn jieklu ikel maħsub għall-ġenitur. Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, huwa biss in-numru ta' nisel ħaj li jrid jingħadd, iżda l-preżenza ta' bajd abortit jew nisel mejjet għandha tiġi rreġistrata.

Mortalità

Mortalità fl-annimali ġenituri għandha tkun irreġistrata, idealment kuljum, jew tal-inqas bl-istess frekwenza li biha jingħadd in-nisel.

Parametri oħrajn

Għalkemm dan il-metodu huwa maħsub prinċipalment sabiex jiġi vvalutat l-eżitu riproduttiv, huwa possibbli li jkun kkwantifikati biżżejjed effetti oħra li jippermettu li ssir analiżi statika. Jista' jiġi rreġistrat l-eżitu riproduttiv għal kull annimal ġenitur, jiġifieri n-numru ta' nisel ħaj prodott matul it-test għal kull ġenitur sopravvissut. Dan it-test jista' jitqabbel mal-varjabbli tar-rispons ewlieni (eżitu riproduttiv għal kull annimal ġenitur fil-bidu tat-test li ma mietx b'mod mhux intenzjonat jew aċċidentali matul it-test). Jekk isseħh mortalità tal-ġenituri f'repliki esposti, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-mortalità ssegwix mudell ta' rispons għall-konċentrazzjoni, eż. jekk hemmx rigressjoni sinifikanti tar-rispons kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test b'pendil pożittiv (għal dan jista' jintuża test statistiku bħat-test tat-tendenza Cochran-Armitage). Jekk il-mortalità ma ssegwix xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, dawk ir-repliki b'mortalità tal-ġenituri għandhom jiġu esklużi mill-analiżi tar-riżultat tat-test. Jekk il-mortalità ssegwi xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, il-mortalità tal-ġenituri għandha tiġi assenjata bħala effett tas-sustanza kimika tat-test u r-repliki ma għandhomx jiġu esklużi mill-analiżi tar-riżultat tat-test. Il-kejl tat-tkabbir ikun tassew siewja għaliex jipprovdu informazzjoni fuq effetti sottoletali possibbli li jistgħu jkun utli għaliex iżidu mal-miżuri ta' riproduzzjoni wahedhom; huwa rakkomandat li jitkejjel it-tul tal-annimali ġenituri (jiġifieri t-tul tal-ġisem minbarra l-ispina anali). Parametri oħrajn li jistgħu jitkejlu jew jiġu kkalkolati jinkludu ż-żmien għall-produzzjoni tal-ewwel duqqajs (u dawk ta' wara), in-numru u d-daqs tad-duqqajs għal kull annimal, in-numru ta' duqqajs abortit, il-preżenza ta' neonati rġiel (OECD, 2008) jew efiċċja u possibbilment ir-rata intrinsika ta' żieda fil-popolazzjoni (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni u l-Appendiċi 7 għall-identifikazzjoni tas-sess tan-neonati).

Il-frekwenza tad-determinazzjonijiet analitiċi u tal-kejl

Il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu, it-temperatura, l-ebusija u l-valuri tal-pH għandhom jitkejlu mill-inqas darba fil-ġimgħa, f'media godda u qodma, fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu ddeterminati f'intervalli regolari.

F'testijiet semistatiċi fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test tkun maħsuba li sejra tibqa' bejn ± 20 fil-mija tan-nominali (jiġifieri fil-limitu ta' 80 — 120 fil-mija- ara l-paragrafi 6, 7 u 39), huwa rrakomandat li, bħala minimu,

▼ **M7**

jigū analizzati l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test meta jkunu ppreparati għodda u fil-hin tat-tigdid darba waqt l-ewwel ġimgha tat-test (jigifieri l-analizijiet għandhom isiru fuq kampjun tal-istess soluzzjoni — meta tkun għadha kemm giet ippreparata u meta tiġgedded). Dawn id-determinazzjonijiet għandhom ikunu irripetuti mill-inqas f'intervalli ta' kull ġimgha wara dan.

Għal testijiet li fihom il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx mahsuba li sejra tibqa' fil-limiti ± 20 fil-mija tan-nominali, huwa neċessarju li ssir analiżi tal-konċentrazzjonijiet kollha tat-test, meta tiġi ppreparata għida jew meta tiġgedded. Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx fl- ± 20 fil-mija tan-nominali iżda tista' tiġi pprovduta biżżejjed evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (jigifieri fil-limitu ta' 80-120 fil-mija tal-konċentrazzjonijiet inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitnaqqsu fil-ġimghat 2 u 3 tat-test għall-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test qabel jiġgeddu tista' ssir freċipjent tar-replika wiehed f'kull konċentrazzjoni tat-test.

Jekk jintuza test bi fluss kontinwu, reġim tal-kampjunar simili għal dak deskritt għat-testijiet semistatiċi jkun adattat (iżda l-kejl ta' soluzzjonijiet “qodma” ma jkunx applikabbli f'dan il-każ). Madankollu, jista' jkun rakkomandat li jiżdied in-numru ta' okkażjonijiet ta' kampjunar matul l-ewwel ġimgha (eż. tliet settijiet ta' kejl) sabiex jiġi żgurat li l-konċentrazzjonijiet tat-test jibqgħu stabbli. F'dawn it-tipi ta' testijiet, ir-rata tal-fluss tad-dilwent u s-sustanza kimika tat-test għandha tiġi vverifikata kuljum.

Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li tkun qiegħda tiġi ttestjata inżammet kif xieraq fl- ± 20 fil-mija tan-nominali jew fil-konċentrazzjoni inizjali matul it-test, mela r-risultati jistgħu jkunu ibbażati fuq il-valuri nominali jew inizjali mkjelin. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni nominali jew dik inizjali mkejla tkun ikbar minn ± 20 fil-mija, ir-risultati għandhom jingħataw f'termini tal-medja ponderata għaž-żmien (ara l-gwida dwar il-kalkolu fl-Appendiċi 6).

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-risultati**

L-iskop ta' dan it-test huwa li jistabbilixxi l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq l-eżitu riproduttiv. In-numru totali ta' nisel ħaj għal kull annimal ġenitur għandu jiġi kkalkolat għal kull reċipjent tat-test (jigifieri replika). Barra minn hekk, ir-riproduzzjoni tista' tiġi kkalkolata fuq il-bażi tal-produzzjoni ta' nisel ħaj mill-organizmu ġenitur li jkun għadu ħaj. Madankollu, l-iktar varjabbli tar-rispons ekoloġikament rilevanti huwa n-numru totali ta' nisel ħaj prodott għal kull annimal ġenitur li ma jmutx b'mod aċċidentali⁽¹⁾ jew mhux intenzjonat⁽²⁾ matul it-test. Jekk l-annimal ġenitur imut b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonat matul it-test, jew jirriżulta li huwa raġel, ir-replika tiġi eskluża mill-analiżi. Imbagħad l-analiżi sejra tkun ibbażata fuq numru iżgħar ta' repliki. Jekk issehh mortalità tal-ġenituri f'repliki esposti, għandu jiġi kkunsidrat jekk il-mortalità ssegwix mudell ta' rispons għall-konċentrazzjoni, eż. jekk hemmx rigressjoni sinifikanti tar-rispons kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test b'pendil pożittiv (għal dan jista' jintuza test statistiku bħat-test tat-tendenza Cochran-Armitage). Jekk il-mortalità ma ssegwix xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, dawk ir-repliki b'mortalità tal-ġenituri għandhom jiġu esklużi mill-analiżi tar-risultat tat-test. Jekk il-mortalità ssegwi xejra ta' rispons għall-konċentrazzjoni, il-mortalità tal-ġenituri għandha tiġi assenjata bħala effett tas-sustanza kimika tat-test u r-repliki ma għandhomx jiġu esklużi mill-analiżi tar-risultat tat-test.

Fil-qosor, meta jintużaw LOEC u NOEC jew EC_x sabiex jesprimu l-effetti, huwa rakkomandat li jiġi kkalkolat l-effett fuq ir-riproduzzjoni bl-użu taż-żewġ varjabbli tar-risponsi msemmijin hawn fuq, jigifieri

⁽¹⁾ Mortalità aċċidentali: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika kkaġunata minn incidenza aċċidentali (jigifieri kawża magħrufa)

⁽²⁾ Mortalità mhux intenzjonata: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika b'kawża mhux magħrufa

▼ **M7**

— bhala n-numru totali ta' nisel haj prodott ghal kull annimal li ma jmutx b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonata matul it-test u;

— bhala n-numru ta' nisel haj prodott ghal kull annimal ġenitur li jibqa' haj;

u mbagħad sabiex jintuza bhala r-riżultat finali, l-inqas valur NOEC u LOEC jew EC_x ikkalkolat bl-użu ta' wiehed minn dawn iż-żewġ varjabbli tar-rispons.

Qabel ma tintuza l-analizi statistika, eż. proċeduri ANOVA, paragun tat-trattamenti għall-kontroll bit-test-t Student, it-test Dunnett, it-test Williams, jew it-test stepdown Jonckheere-Terpstra, huwa rakkomandat li tiġi kkunsidrata t-trasformazzjoni ta' dejta jekk ikun hemm bżonn għall-issodsfar tar-rekwiżiti tat-test statistiku partikolari. Bhala alternattivi mhux parametriċi, wiehed jista' jikkunsidra t-testijiet Dunn jew Mann-Whitney. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati għal medji tat-trattamenti individwali.

In-numru ta' ġenituri sopravissuti fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità, u għandu jiġi ddokumentat u rrapportat. Anki l-effetti dannużi kollha l-oħrajn ukoll, eż. imġiba anormali u sejbiet tossikoloġiċi sinifikanti, għandhom jiġu rrapportati fir-rapport finali.

EC_x

Il-valuri EC_x , inklużi l-limiti ta' kunfidenza inferjuri u superjuri assoċjati magħhom huma kkalkolati bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa (eż. il-funzjoni loġistika jew ta' Weibull, il-metodu ta' Spearman-Kärber trimmjat, jew sempliċi interpolazzjoni). Sabiex tiġi kkalkolata l- EC_{10} , EC_{50} jew kwalunkwe EC_x oħra, is-sett shih ta' dejta għandu jkun soġġett għal analiżi tar-riġressjoni.

NOEC/LOEC

Jekk analiżi statistika jkollha l-għan li ssib l-NOEC/LOEC, għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument 54 tal-OECD dwar Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (4). B'mod ġenerali, effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-kontroll huma investigati bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi fuq naha waħda b' $p \leq 0.05$.

Distribuzzjoni normali u omoġenità tal-varjanza jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' test statistiku xieraq, eż. it-test ta' Shapiro-Wilk u t-test ta' Levene, rispettivament ($p \leq 0.05$). Jistgħu jsiru ANOVA unidirezżjonali u testijiet multiparaguni sussegwenti. Jistgħu jintużaw testijiet b'bosta paraguni (eż. it-test ta' Dunnett) jew testijiet tax-xejriet riġressivi (eż. it-test ta' Williams, jew it-test stepdown ta' Jonckheere-Terpstra) sabiex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi importanti ($p \leq 0.05$) bejn il-kontrolli u l-bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (għażla tat-test irrakkomandat skont id-Dokument ta' Gwida 54 tal-OECD (4)). Inkella, jistgħu jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. test-U-Bonferroni skont it-test tax-xejriet ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) sabiex jiġu stabbiliti l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

Jekk sar test tal-limitu (paragun tal-kontroll u trattament wiehed biss) u l-prekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametrik (normalità, omoġenità) huma ssodisfati, ir-risponsi metriċi jistgħu jiġu evalwati mit-test ta' Student (test-t). Jista' jintuza test-t tal-varjanza mingħajr ekwivoku (bħat-test ta' Welch) jew test mhux parametrik, bħat-test ta' Mann-Whitney-U, jekk ma jkunux issodisfati dawn ir-rekwiżiti.

Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent jew kontroll dispersiv), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

▼ **M7****Rapport tat-test**

Ir-rapport tat-test jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test:

- l-ghamla fizika u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti;
- dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika, inkluża l-purità.

Speċijiet tat-test:

- il-klonu (jekk ġiex tipat genetikament), il-fornitur jew is-sors (jekk magħruf) u l-kundizzjonijiet tal-kultura użati. Jekk tintuża speċi differenti minn *Daphnia magna*, din għandha tiġi rrapportata u ġġustifikata.

Kundizzjonijiet tat-test:

- il-proċedura tat-test użata (eż. semistatika jew fluss kontinwu, il-volum, it-tagħbija f'numru ta' *Daphnia* kull litru);
- il-fotoperjodu u l-intensità tad-dawl;
- id-disinn tat-test (eż. numru ta' repliki, numru ta' ġenituri għal kull replika);
- dettalji dwar il-medium tal-kultura użat;
- jekk jintużaw, zidiet ta' materjali organiċi inklużi l-kompożizzjoni, is-sors, il-metodu ta' thejjija, it-TOC/COD tal-preparazzjonijiet tal-istokk, stima tat-TOC/COD li jirriżultaw fil-medium tat-test;
- informazzjoni dettaljata dwar l-għalf, inkluż ammont (f'mg C/*daphnia*/jum) u l-iskeda (eż. tip ta' ikel, inkluż għall-algi b'ismijiet speċifiċi (speċi) u, jekk magħrufin, ir-razza, il-kundizzjonijiet tal-kultura);
- metodu tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna u l-frekwenza tat-tiġdid (is-solvent jew l-aġent dispersiv u l-konċentrazzjoni tagħhom għandhom jingħataw, meta jintużaw).

Ir-riżultati:

- riżultati minn kwalunkwe studju preliminari fuq l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test;
- il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali u r-riżultati tal-analiżijiet kollha sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test (ara l-iskedi ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 5); l-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-limitu tad-determinazzjoni għandhom ikunu irrapportati wkoll;
- il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test (jiġifieri l-pH, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, u TOC u/jew COD u l-ebusija fejn applikabbli (ara l-iskedi ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 4);
- ir-rekord shih tal-produzzjoni ta' niesl ħaj matul it-test minn kull animal ġenitur (ara l-iskeda ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 4);
- in-numru ta' mwiet fost l-annimali ġenituri u l-jum meta seħħew (ara l-iskedi ta' dejta ta' eżempju fl-Appendiċi 4);
- il-koeffiċjent ta' varjazzjoni għall-eżitu riproduttiv fil-kontroll (fuq il-bażi tan-numru totali ta' niesl ħaj għal kull animal ġenitur ħaj fi tmiem it-test);
- il-plott tan-numru totali ta' niesl ħaj prodott għal kull ġenitur ħaj f'kull replika eskluż kwalunkwe animal ġenitur li seta' miet b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonat matul it-test kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;

▼M7

- kif xieraq, ipplottja n-numru totali ta' nisel haj prodott għal kull animal ġenitur li jkun għadu haj f'kull replika kontra l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test
- fejn xieraq, il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) għar-riproduzzjoni, inkluża deskrizzjoni tal-proċeduri statistiċi użati u indikazzjoni ta' x'daqs tal-effett jista' jkun mistenni li jiġi individwat (analizi tas-saħħa tista' ssir qabel ma jibda l-esperiment sabiex jiġi pprovdut) u l-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) għar-riproduzzjoni; l-informazzjoni li fuqha ntūza l-varjabbli tar-rispons għall-kalkolu tal-valur tal-LOEC u l-NOEC (jew bhala nisel haj totali għal kull organiżmu matern li ma mietx b'mod aċċidentali jew mhux intenzjonat matul it-test jew bhala numru totali ta' nisel haj għal kull organiżmu matern li jkun għadu haj), fejn xieraq, għandhom jiġu rrapportati wkoll l-LOEC u l-NOEC għall-mortalità tal-annimali ġenituri;
- fejn xiearq, l-ECx għar-riproduzzjoni u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 90 % jew 95 %) u graff tal-mudell iffittjat użat għall-kalkolu ta' dawn, il-pendil tal-kurva ta' konċentrazzjoni — rispons u l-iżball standard tagħha;
- kejliet jew effetti bijoloġiċi osservati oħrajn: irrapporta kwalunkwe effett bijoloġiku ieħor li ġie osservat jew li tkejjel (eż. tkabbir ta' annimali ġenituri) inkluża kwalunkwe ġustifikazzjoni xierqa;
- spjegazzjoni ta' kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu ta' ttestjar.

TAGHRIF

- (1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.
- (2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.
- (3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.
- (4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.
- (5) Baird, D.J., *et al.* (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotox. and Environ. Safety*, 21, 257-265.
- (6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.
- (7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods
- (8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, 775-782.
- (9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Fi: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA
- (10) Baird, D.J., *et al.* (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. Fi: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼ M7

- (11) Parkhurst, B.R., J.L. Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.
- (12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2): 185-196.
- (13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.
- (14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.
- (15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Għall-finijiet ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Mortalità aċċidentali: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika kkaġunata minn inċidenza aċċidentali (jiġifieri kawża maghrufa)

Sustanza Kimika: sustanza jew tahlita.

EC_x: il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test dissolta fl-ilma li tirriżulta fi tnaqqis ta' x fil-mija fir-riproduzzjoni ta' *Daphnia* fi hdan perjodu ta' esponiment ddikjarat.

Mortalità mhux intenzjonata: mortalità mhux marbuta mas-sustanza kimika b'kawża mhux maghrufa.

Rata intrinsika ta' żieda fil-popolazzjoni: kejl tat-tkabbir tal-popolazzjoni li jintegra l-eżitu riproduttiv u l-mortalità speċifika għall-età (1) (2) (3). F'popolazzjonijiet fi stat stazzjonarju, sejra tkun żero. Għall-popolazzjonijiet li qeghdin jikbru din tkun positiva u għall-popolazzjonijiet li qeghdin jonqsu din tkun negattiva. Huwa ċar li tal-ahhar mhijiex sostenibbli u finalment sejra twassal għal estinzjoni.

Limitu ta' detezzjoni: l-inqas konċentrazzjoni li tista' tiġi identifikata iżda mhux ikkwantifikata.

Limitu ta' determinazzjoni: l-inqas konċentrazzjoni li tista' titkejjel b'mod kwantitattiv.

Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC): l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza hija osservata li jkollha effett statistikalment sinifikanti fuq ir-riproduzzjoni u l-mortalità tal-ġenituri (b'p < 0.05) meta mqabbla mall-kontroll, fi hdan perjodu ta' esponiment stipulat. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha li jkunu oghla mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż daqs jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu sodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni shiha dwar kif intgħazlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Mortalità: annimal huwa rreġistrat bħala mejjet meta jkun immobbli, jiġifieri meta ma jkunx aktar kapaci jghum, jew jekk ma jkun osservat ebda moviment tal-appendiċi jew tal-postaddome, fi żmien 15-il sekonda minn theżżiża bil-galbu tal-kontenitur tat-test. (Jekk tintuża definizzjoni ohra, din għandha tkun irrappor-tata flimkien mar-referenza tagħha).

Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC): il-konċentrazzjoni tat-test eżatt inqas mil-LOEC, li meta titqabbel mal-kontroll, ma jkollha l-ebda effett statisti-kament sinifikanti (p < 0.05), fi hdan perjodu ta' esponiment stipulat.

Nisel: id-*Daphnia* żgħar prodotti mill-annimali ġenituri waqt it-test.

Annimali Ġenituri: dawk id-*Daphnia* femminili li jkunu preżenti fil-bidu tat-test u li l-eżitu riproduttiv tagħhom ikun l-oġġett ta' studju.

Eżitu riproduttiv: in-numru ta' nisel haj prodott mill-annimali ġenituri fi hdan il-perjodu ta' ttestjar

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

Tagħrif

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼ M7

- (2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- (3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼ **M7**

Appendiċi 2

**PREPARAZZJONI TAL-MEDIA ELENDT M7 U M4 DEFINITI
KOMPLETAMENT****Akklimazzjoni għall-media Elendt M7 u M4**

Xi laboratorji sabu xi diffikultajiet meta trasferixxew direttament id-*Daphnia* għal media M4 (1) u M7. Madankollu, kien hemm xi suċċess b'akklimazzjoni gradwali, jiġifieri biċ-ċaqliq mill-medium proprju għal 30 % Elendt, u wara għal 60 % Elendt u mbagħad għal 100 % Elendt. Il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni jistghu jidmumu sa xahar.

Preparamenti*Mikroelementi*

L-ewwel jithejjew soluzzjonijiet ewlenin separati (I) ta' mikroelementi individwali fl-ilma ta' purità xierqa, eż. dejonizzat, distillat jew b'ożmożi riversa. Minn dawn is-soluzzjonijiet ewlenin differenti (I) tithejja t-tieni soluzzjoni ewlenija waħedha (II), li jkun fiha l-mikroelementi kollha (soluzzjoni kombinata), jiġifieri:

Soluzzjoni(jiet) ewlenija/ ewlenin I (sustanza waħedha)	Ammont miżjud mal- ilma	Konċentrazzjoni (relata- tata mal-medium M4)	Sabiex tithejja soluzzjoni ewlenija kombinata II, zid l- ammont li ġej ta' soluzzjoni ewlenija I mal-ilma	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 darba	1,0	0,25
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	7 210	20 000 darba	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 darba	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 darba	1,0	0,25
SrCl ₂ · 6 H ₂ O	3 040	20 000 darba	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 darba	1,0	0,25
Mo Na ₂ O ₄ · 2 H ₂ O	1 260	20 000 darba	1,0	0,25
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	335	20 000 darba	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000 darba	1,0	1,0
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200	20 000 darba	1,0	1,0
KI	65	20 000 darba	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 darba	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 darba	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 000	2 000 darba	—	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 991	2 000 darba	—	—
Iż-żewġ soluzzjonijiet Na ₂ EDTA u FeSO ₄ jithejjew waħedhom, jitferrgħu flimkien u jiġu awtoklavati minnufih. Dan jagħti:				
Soluzzjoni Fe-EDTA		1 000 darba	20,0	5,0

▼ **M7***Media M4 u M7*

Il-media M4 u M7 jiġu ppreparati bl-użu tas-soluzzjoni ewlenija II, il-makronutrijenti u l-vitamini kif ġej:

	Ammont miżjud mal-ilma	Koncentrazzjoni (relata mal-medium M4)	Ammont ta' soluzzjoni ewlenija miżjuda sabiex jiġi ppreparat il-medium	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Soluzzjoni ewlenija II (mikroelementi kombinati)		20 darba	50	50
Soluzzjonijiet ewlenija makronutrijenti (sustanza waħedha)				
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1 000 darba	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	2 000 darba	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 darba	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000 darba	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	5 000 darba	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000 darba	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 darba	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000 darba	0,1	0,1
Stokk tal-Vitamini Kombinati	—	10 000 darba	0,1	0,1

Is-soluzzjoni ewlenija tal-vitamini kombinati tithejja billi jiżdiedu t-3 vitamini ma' litru ilma, kif muri hawn taht:

	mg/l			
Kloridrat tat-tjamina	750	10 000 darba		
Ċjanokobalamin (B ₁₂)	10	10 000 darba		
Bijotina	7,5	10 000 darba		

L-istokk tal-vitamini kombinati jinħażen f'alikwoti żgħar. Il-vitamini jiżdiedu fil-media f'tit qabel l-użu.

N.B: Sabiex tiġi evitata l-preċipitazzjoni tal-imluh meta jithejjew il-media shah, žid l-alikwoti tas-soluzzjonijiet ewlenin ta' madwar 500 — 800 ml ilma dejonizzat u mbagħad imla sa litru.

N.N.B L-ewwel pubblikazzjoni tal-medium M4 tista' tinstab f'Elendt, B.P. Selenium deficiency in crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

▼ **M7***Appendiċi 3***ANALIŻI TA' KARBONJU ORGANIKU TOTALI (TOC) U L-PRODUZZJONI TA' NOMOGRAFF GHALL-KONTENUT TA' TOC TAL-GHALF TAL-ALGA**

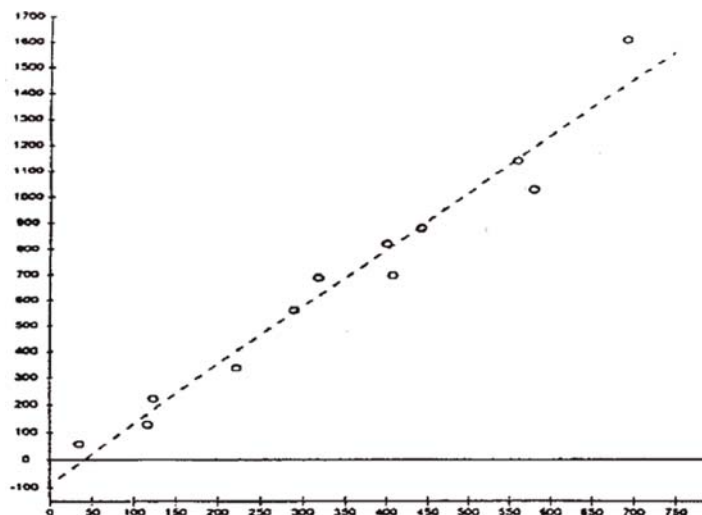
Huwa rikonoxxut li l-kontenut ta' karbonju tal-ghalf tal-alga normalment ma jitkejjilx direttament iżda minn korrelazzjonijiet (jiġifieri nomografi) b'miżuri sostituti bhall-ghadd taċ-ċelloli tal-alga jew l-assorbiment tad-dawl).

It-TOC għandu jitkejjel b'ossidazzjoni tat-temperatura għolja minflok b'metodi tal-UV jew tal-persulfat. (Għal pariri, ara: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Għall-produzzjoni ta' nomograff, l-algi għandhom ikunu sseparati mill-medium tat-ktabbir b'centrifugazzjoni segwita mir-risospensjoni f'ilma distillat. Kejjel il-parametru sostitut u l-konċentrazzjoni TOC f'kull kampjun fi triplikat. Inbjanki ta' ilma distillat għandhom ikunu analizzati u l-konċentrazzjoni ta' TOC trid titnaqqas minn dik tat-TOC tal-kampjun tal-algi.

In-nomografi għandhom ikunu lineari tul il-medda mehtieġa ta' konċentrazzjonijiet ta' karbonju. Hawn taht jinghataw eżempji.

N.B dawn ma għandhomx jintużaw għal konverżjonijiet; huwa essenzjali li l-laboratorji jippreparaw in-nomografi tagħhom.



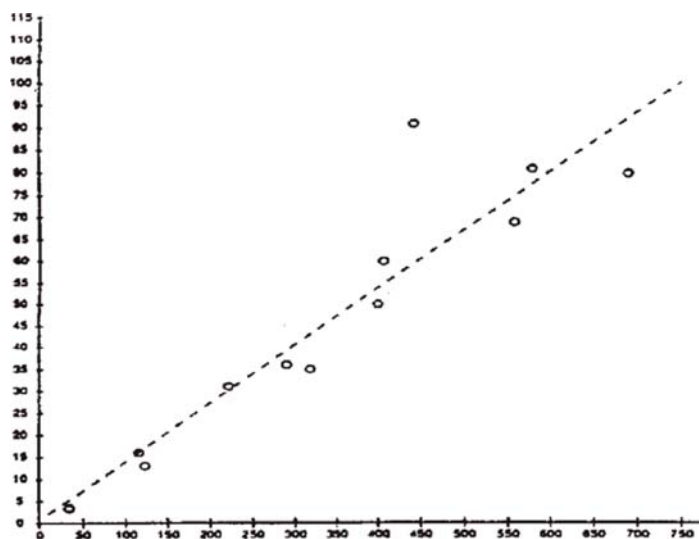
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Rigressjoni ta' mg/l piż niedi fuq mg C/l. Dejta mis-sospensjonijiet ikkonċentratati ta' celloli kkulturati tal-lott semikontinwi, risospizi f'ilma distillat.

assi x: mg C/l ta' għalf tal-alga kkonċentrat

assi y: mg/l piż xott ta' għalf tal-alga kkonċentrat

Koeffiċjent ta' korrezzjoni – 0,980

▼ M7

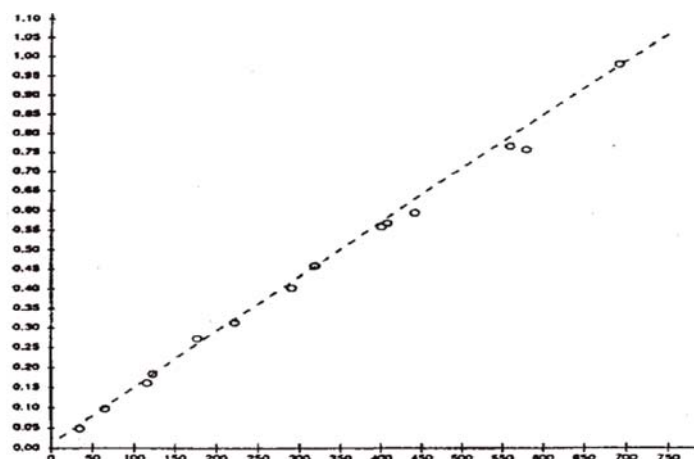
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Rigressjoni tan-numru ta' ċelloli fuq mg C/l. Dejta mis-sospensjonijiet ikkonċentratati ta' ċelloli kkulturati tal-lott semikontinwi, risospizi f'ilma distillat.

assi x: mg C/l ta' għalf tal-alga kkonċentrat

assi y: Nru ċelloli/l tal-għalf tal-alga kkonċentrat

Koeffiċjent ta' korrezzjoni – 0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Rigressjoni tal-assorbiment fuq mg C/l (tul tal-passaġġ ta' 1 cm). Dejta mis-sospensjonijiet ikkonċentratati ta' ċelloli kkulturati tal-lott semikontinwi, risospizi f'ilma distillat.

assi x: mg C/l ta' għalf tal-alga kkonċentrat

assi y: Assorbiment f'440 nm ta' dilwizzjoni ta' 1/10 tal-għalf tal-alga kkonċentrat

Koeffiċjent ta' korrezzjoni – 0,998

SKEDA TA' DEJTA TA' EŻEMPJU GHAR-REĠISTRAZZJONI TAT-TIĠDID TAL-MEDIUM, ID-DEJTA FIŻIKA/KIMIKA TA' MONITORAĠĠ, IT-TAGHLIF, IR-RIPRODUZZJONI TAD-DAPHNIA U L-MORTALITÀ TAL-ĠENITURI

Esperiment Nru:	Data tal-bidu:						Klonu:				Medium:					Tip ta' ikel:					Sustanza Kimika tat-Test:						Konċ nominali:	
Jum	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21						
Tiġdid tal-medium (immarka)																												
pH (*)																								ġdid				
																								qadim				
O ₂ (mg/l) (*)																								ġdid				
																								qadim				
Temp (°C) (*)																								ġdid				
																								qadim				
Ikel ipprovdut (immarka)																												
Nru ta' nisel ħaj (**)																									Total			
Reċipjent 1																												
2																												
3																												
4																												
5																												

▼ **M7**

Esperiment Nru:	Data tal-bidu:						Klonu:				Medium:					Tip ta' ikel:					Sustanza Kimika tat-Test:						Konċ nominali:	
Jum	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21						
6																												
7																												
8																												
9																												
10																												
																											Total	
Mortalità kumulattiva tal- ġenituri (***)																												

(*) Indika liema reċipjent intuza għall-esperiment

(**) Nizzel id-duqqajs abortit bħala “AB” fil-kaxxa rilevanti

(***) Nizzel il-mortalità ta' kwalunkwe annimali ġenituri bħala “M” fil-kaxxa rilevanti

▼ M7

Appendici 5

SKEDA TA' DEJTA TA' EŻEMPJU GHAR-REĠISTRAZZJONI TA' RIŻULTATI TAL-ANALIŻI KIMIKA

(a) Il-konċentrazzjonijiet imkejlin

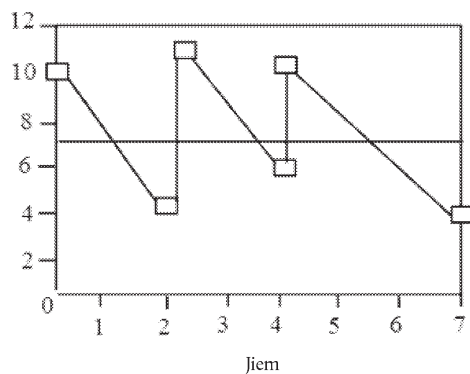
[illegible]

(b) **Il-koncentrazzjonijiet imkejlina bhala perċentwali tan-nominali**

[illegible]

▼ **M7***Appendiċi 6***KALKOLU TAL-MEDJA PONDERATA GHALL-HIN****Il-medja kkalkolata għall-hin**

Meta wiehed iqis li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test tul il-perjodu bejn it-tigdidiet tal-medium, hemm bżonn li jiġi kkunsidrat liema konċentrazzjoni għandha tingħażel sabiex tirrappreżenta l-medda ta' konċentrazzjonijiet esperjenzati mid-*Daphnia* ġenituri. L-għażla għandha tkun ibbazata fuq kunsiderazzjonijiet bioloġiċi kif ukoll statistiċi. Pereżempju, jekk huwa mahsub li r-riproduzzjoni hija l-aktar milquta mill-konċentrazzjoni massima esperjenzata, allura għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni. Madankollu, jekk l-effett akkumulat jew l-effett aktar fit-tul tas-sustanza kimika tossika huwa kkunsidrat bħala aktar importanti, allura l-konċentrazzjoni medja hija aktar rilevanti. F'dan il-każ, ikun xieraq li tintuża medja tal-konċentrazzjoni ponderata għall-hin, peress li din tqis il-varjazzjoni fil-konċentrazzjoni istantanja fuq medda ta' żmien.

*Figura 1***Eżempju tal-medja ponderata għall-hin**

Il-Figura 1 turi eżempju ta' test (simplifikat) li jdum sebat ijiem b'tigdid tal-medium fil-jiem 0, 2 u 4.

- Il-linja zigzawġa irriqqa tirrappreżenta l-konċentrazzjoni fi kwalunkwe waqt. It-tnaqqis fil-konċentrazzjoni huwa supponut li jsegwi proċess ta' degradazzjoni esponenzjali.
- Is-6 punti pplotjati jirrappreżentaw il-konċentrazzjonijiet osservati mkejlin fil-bidu u fi tmiem kull perjodu ta' tigdid.
- Il-linja solida u hoxna tindika l-pożizzjoni tal-medja ponderata għall-hin.

Il-medja ponderata għall-hin hija kkalkolata b'tali mod li l-erja taht il-medja ponderata għall-hin tkun daqs l-erja taht il-kurva ta' konċentrazzjoni. Il-kalkolu għall-eżempju ta' hawn fuq jintwera fit-Tabella 1.

*Tabella 1***Kalkolu tal-Medja ponderata għall-hin**

Tigdid Nru	Jiem	Konc 0	Konc 1	Ln(Konc 0)	Ln(Konc 1)	Erja
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼ **M7**

Tigdid Nru	Jiem	Konċ 0	Konċ 1	Ln(Konċ 0)	Ln(Konċ 1)	Erja
Jiem Totali:	7					Erja Totali: 50,092
						Medja tat-TW: 7,156

Jiem huwa n-numru ta' jiem fil-perjodu ta' tigdid

Konċ 0 hija l-konċentrazzjoni mkejla fil-bidu ta' kull perjodu ta' tigdid

Konċ 1 hija l-konċentrazzjoni mkejla fi tmiem kull perjodu ta' tigdid

Ln(Konċ 0) hija l-logaritma naturali tal-Konċ 0

Ln(Konċ 1) hija l-logaritma naturali tal-Konċ 1

L-erja hija l-erja taht il-kurva esponenzjali għal kull perjodu ta' tigdid. Il-vijabbiltà hija kkalkolata bi:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Il-medja ponderata għall-hin (*Medja tat-TW*) hija l-*Erja Totali* diviża bil-*Jiem Totali*.

Naturalment, għat-test tar-riproduzzjoni tad-*Daphnia*, it-tabella għandha tiġi estiża sabiex tkopri 21 jum.

Huwa ċar li meta jsiru osservazzjonijiet biss fil-bidu u fit-tmiem ta' kull perjodu ta' tigdid, mhuwiex possibbli li jiġi kkonfermat li l-proċess ta' thassir huwa, fil-fatt, esponenzjali. Kurva differenti tirriżulta f'kalkolu differenti għall-Erja. Madankollu, il-proċess ta' degradazzjoni esponenzjali huwa plawżibbli u aktarx li huwa l-aħjar kurva li tista' tintuża fin-nuqqas ta' aktar informazzjoni.

Madankollu, hemm bżonn li jsir xogħol bil-galbu jekk l-analizi kimika tonqos milli ssib xi sustanza kimika fi tmiem il-perjodu ta' tigdid. Kemm-il darba ma jkunx possibbli li ssir valutazzjoni ta' kemm is-sustanza kimika tisparixxi malajr mis-soluzzjoni, inkun impossibbli li tinkiseb erja realistika taht il-kurva u għalhekk ikun impossibbli li tinkiseb medja raġonevoli ponderata għall-hin.

▼ M7

Appendiċi 7

GWIDA GHALL-IDENTIFIKAZZJONI TAS-SESS NEONAT

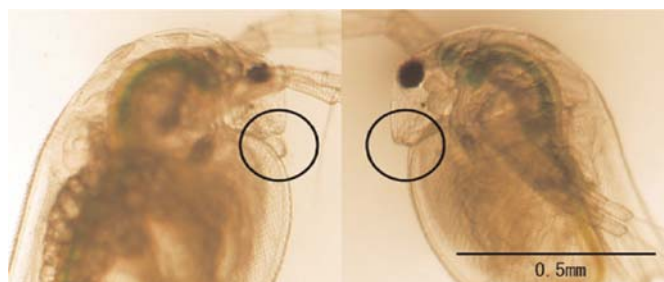
Il-produzzjoni ta' rġiel neonati tista' ssehh f'kundizzjonijiet ambjentali li jinbidlu, bhal fotoperjodu li jiqsar, temperatura, konċentrazzjoni inqas ta' ikel, u densità tal-popolazzjoni li tiżdied (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al.*, 1992). Il-produzzjoni ta' rġiel hija rispons maghruf għal ċerti regolaturi tat-tkabbir ta' insetti (Oda *et al.*, 2005). F'kundizzjonijiet li fihom stressaturi kimiċi jkun qeghdin jinduċu tnaqqis fin-nisel riproduttiv min-nisa partenogeniċi, ikun mistenni numru ikbar ta' rġiel (OECD, 2008). Fuq il-bażi tal-informazzjoni disponibbli, mhuwiex possibbli li jitbassar liema mill-proporzjon tas-sess jew mill-punt ta' tmiem tar-riproduzzjoni sejjer ikun iktar sensittiv; madankollu, hemm indikazzjonijiet (referenza "rapport ta' validazzjoni", parti 1) li din iż-żieda fin-numru ta' rġiel tista' tkun inqas sensittiva miż-żieda fin-nisel. Peress li l-iskop primarju tal-metodu ta' ttestjar huwa li jivvaluta n-numru ta' nisel prodott, il-feġġa ta' rġiel hija osservazzjoni fakultattiva. Jekk dan il-punt ta' tmiem fakultattiv jiġi evalwat fi studju, għandu jintuża kriterju ta' validità addizzjonali tat-test ta' mhux iktar minn 5 % irġiel fil-kontrolli.

L-iktar mod Prattiku u faċli kif jiġu differenzjati s-sessi tad-*Daphnia* huwa li jintużaw il-karatteristiċi fenotipiċi tagħhom, peress li l-irġiel u n-nisa huma ġenetikament l-istess u s-sess tagħhom jiġi stabbilit mill-ambjent. L-irġiel u n-nisa huma differenti fit-tul u fil-morfologija tal-ewwel antenni, li huma itwal fl-irġiel milli fin-nisa (Fig. 1). Din id-differenza tingharaf mill-ewwel wara t-twelid, għad li jiżviluppaw karatteristiċi sesswali sekondarji oħrajn huma u jikbru (eż. ara l-Fig. 2 f'Olmstead and LeBlanc, 2000).

Sabiex jiġi osservat is-sess morfologiku, neonati prodotti minn kull annimal tat-test għandhom jiġu ttrasferiti b'pipetta u jitqiegħdu f'dixx petri bil-medium tat-test. Il-medium jinżamm għal minimu sabiex jiġi ristrett il-moviment tal-animali. L-osservazzjoni tal-ewwel antenni tista' ssir taht sterjomikroskopju ($\times 10-60$).

Fig. 1

***D. magna* raġel (xellug) u mara (lemin) f'eż ta' 24 siegħa. L-irġiel jistghu jingharfu minhabba t-tul u l-morfologija tal-ewwel antenni tagħhom meta mqabblin man-nisa, kif muri fiċ-ċrieki (Tatarazako *et al.*, 2004).**



REFERENZI

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼ M7

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.



C.21. MIKROORGANIŻMI TAL-HAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAN-NITROĠENU

1. METODU

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 216 (2000)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-Testijiet jiddiskrivi metodu tal-laboratorju iddisinjat sabiex jinvestiga l-effetti fit-tul ta' kimiċi, wara espożizzjoni waħda, dwar l-attività tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu fil-mikroorganizmi tal-hamrija. It-test huwa prinċipalment ibbażat fuq ir-rakkommandazzjonijiet ta' l-Organizzazzjoni għall-Protezzjoni tal-Pjanti Ewropej u tal-Mediterran (1). B'dana kollu, Linji ta' Gwida oħrajn, inklużi dawk tal-Biologische Bundesanstalt tal-Ġermanja (2), il-US Environmental Protection Agency (3) il-SETAC (4) u International Organization for Standardization (ISO) (5), kienu wkoll meqjusa. Laqgħa ta' ħidma tal-OECD dwar is-Selezzjoni tal-hamrija/sediment li kienet inżammet fi Belgrate, l-Italja, fil-1995 (6) qabel dwar in-numru u t-tipi tal-hamrija għall-użu f'dan it-test. Rakkommandazzjonijiet dwar il-ġbir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjun tal-hamrija huma ibbażati fuq id-Dokument ta' Gwida ISO (7) u r-rakkommandazzjonijiet mil-Laqgħa ta' Ħidma ta' Belgrate. Fl-assaġġ u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tas-sustanzi tat-test, determinazzjoni ta' l-effetti fuq l-attività mikrobjali tal-hamrija tista tkun meħtieġa, eż., meta l-informazzjoni dwar l-effetti potenzjali min-naħa tal-protezzjoni tal-prodotti ta' l-uċuħ fuq il-mikroflora tal-hamrija huma meħtieġa jew meta l-espożizzjoni ta' mikroorganizmi tal-hamrija lejn kimiċi appartni milli l-prodotti tal-protezzjoni tal-hamrija, jkunu mistennija. It-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa mwettaq sabiex jiddetermina l-effetti ta' tali kimiċi fuq il-mikroflora tal-hamrija. Jekk l-agrikimiċi (eż., il-prodotti tal-protezzjoni tal-hamrija, l-fertilizzanti, u l-kimiċi tal-foresterija) huma ittestjati, kemm it-trasformazzjoni tan-nitroġenu u wkoll it-testijiet tat-trasformazzjoni tal-karbonu, huma mwettqa. Jekk dawk li ma humiex l-agrokimiċi huma ittestjati, it-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa suffiċjenti. B'dana kollu, jekk il-valuri EC50 tat-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu għal tali kimiċi jidhol fi hdan il-medda miosjuba għal inibituri tan-nitrifikazzjoni kummerċjalment disponibbli (eż. nitrapyrin), test tat-trasformazzjoni tal-karbonu jista jkun imwettaq sabiex tkun akkwistata aktar informazzjoni.

Il-hamrija tikkonsisti minn komponenti ħajjin u mhux-ħajjin li jeżistu f'taħlittet kumplessi u eteroġenji. Il-mikroorganizmi għandhom parti ta' rwol impożtanti fit-tfarrik u t-traformazzjoni tal-meterja organika f'hamrija fertili b'ħafna speċje jikkontribwixxu għal diversi aspetti tal-fertili tal-hamrija. Kwalunkwe interferenza fit-tul ma dawn il-proċessi biokimiċi jista jkollha l-potenzal li tinterferixxi maċ-ċiklu tan-nutrient u dan jista jibdel il-fertilità tal-hamrija. It-trasformazzjoni tal-karbonju u n-nitroġenu isseħh fil-hamrija fertili kollha. Għalkemm il-komunitajiet mikrobjali responsabbli għal dawn il-proċessi jiddifferixxu bejn hamrija u oħra, il-mezzi tat-trasformazzjoni huma essenzjalment l-istess.

Dan il-Metodu ta' Testijiet kif deskritt huwa iddisinjat sabiex jiżvela l-effetti ħżiena ta' terminu fit-tul ta' sustanza dwar il-proċess tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu f'hamrija erobika tal-wiċċ. Dan il-Metodu tat-test jippermetti wkoll l-estimi ta' l-effetti tas-sustanzi fuq it-trasformazzjoni tal-karbonju mill-mikroflora tal-hamrija. Il-formazzjoni tan-nitrat isseħh sussegwentament għad-degenerazzjoni tar-rabtiet karbonju-nitroġenu. Għalhekk, jekk rati egwali tal-produzzjoni tan-nitroġenu jkunu misjuba f'hamrija ittrattata u tal-kontroll, dan huma ferm probabbli minhabba li l-passaġġi tad-degradazzjoni maġġura tal-karbonju huma intatti u funzjonali. Is-substrata magħżulha għat-test (tagħside luċerna fi trab) għandha telattività favorevoli ta' karbonju u nitroġenu (normalment bejn 12/1 u 16/1). Minhabba dan, in-nuqqas ta' karbonju huma aġevolati matul it-test u jekk il-komunitajiet mikrobjali huma bil = ħsara kinn xi kimika, dawn jistgħu jirkupraw fi żmien 100 jum.

▼B

It-testijiet li minnhom dn il-metodu ta' testijiet kien gie żviluppat kien u primarjament iddisinjati għal sustanzi li dwarhom l-ammont li jilhaq il-hamrija setgħa jkun anticipat. Dan hu l-każ, per eżempju, għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ li dwarhom ir-rata ta' l-applikazzjoni fl-ghelieqi hija magħrufa. Għall-agrokimiki, it-testijiet ta' żewġ dozi relevanti għar-rata anticipata jew imbassra ta' l-applikazzjoni huma suffiċjenti. L-agrokimiċi jistgħu ikunu ittestjati bħala ingredjenti attivi (a.i.) jew prodotti formulati. B'dana kollu, it-test mhux limitat għall-agrokimiċi. Bit-tibdil kemm ta' l-ammonti tas-sustanza tat-test applikata fil-hamrija, u il-mod ta' kif l-informazzjoni hija evalwata, it-test jista' wkoll ikunu użat għal kimiċi li dwarhom l-ammont mistenni li jilhaq il-hamrija ma jkunx magħruf. Għalhekk, bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi, l-effetti ta' serje ta' konċentrazzjonijiet dwar it-trasformazzjoni tan-nitroġenu, huma determinati. L-informazzjoni minn dawn it-testijiet hija użata sabiex tipprepara il-kurva tad-doża-reazzjoni u tikkalkola il-valuri EC_x , meta x hija definita bħala % effett.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Trasformazzjoni tan-nitroġenu: Hija d-degradazzjoni aħharja mill-mikroorganizmi tal-materja organika li jkun fiha n-nitroġenu, via l-proċess ta' l-ammonifikazzjoni u n-nitrifikazzjoni, lejn in-nitrat inorganiku tal-prodott finali rispettivament.

EC_x (Konċentrazzjoni Effettiva): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hamrija li tirriżulta f' x percentaġġ inibizzjoni tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu lejn nitrat.

EC_{50} (Konċentrazzjoni Effettiva Medjana): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hamrija li tirriżulta fi 50 percentaġġ (50 %) inibizzjoni tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu lejn nitrat.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn

1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Hamrija mgħarbla hija emendata ma tghasida tal-pjanti li ssir trab u jew ittrattata bis-sustanza tat-test jew imħollija mhux ittrattata (kontroll). Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, minimu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test huma rakkommandati u dawn għandhom ikunu magħżula b'reazzjoni ma l-ghola konċentrazzjoni anticipata fl-ghalqa. Wara 0, 7, 14-il jum u 28 jum ta' l-inkubazzjoni, kampjuni ta' hamrija ittrattata u tal-kontroll huma estratti bis-solvent xieraq, u l-kwantitajiet ta' nitrat fl-estratti huma determinati. Ir-rata tal-formazzjoni tan-nitrat fil-kampjuni ittratti huwa paragonata mar-rata fil-Kontrolli, u d-fevjazzjoni perċentwali ta' dik ittrattata mill-kontroll hija ikkalkolata. It-testijiet kollha jkunu mill-anqas ta' 28 jum. Jekk, fit-28 jum, id-differenzi bejn il-hamrija ittrattata u dik mhux ittrattata huma egwali jew akbar minn 25 %, il-kejl jitkompla sa massimu ta' 100 jum. Jekk agrokimiċi huma ittestjati, serje ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma miżjuda mal-kampjuni tal-hamrija, u l-kwantitajiet tan-nitrat iffurmat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma mkejla wara 28 jum ta' inkubazzjoni. Ir-riżultati mit-testijiet b'konċentrazzjonijiet multipli huma analizzati bl-użu ta' mudell regressiv, u l-valuri EC_x huma ikkalkolati (i.e. EC_{50} , EC_{25} u/jew EC_{10}). Ara definizzjonijiet.

1.5. IL-VALIDITÀ TAT-TEST

L-evalwazzjonijiet tar-riżultati tat-test ma l-agrokimiċi huma bbażati fuq relattivament differenzi żgħir (i.e. medja ta' valur ± 25 %) bejn il-konċentrazzjonijiet nitriċi fil-hamrija tal-kontroll u f'dik ittrattata, għalhekk varjazzjonijiet kbar fil-kontrolli jistgħu jwasslu għal riżultati foloz. Għalhekk, il-varjazzjoni bejn kampjuni mġedda tal-kontroll għandha tkun ta' anqas minn ± 15 %.

▼B**1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST****1.6.1. Apparat**

Il-kontenituri tat-test użati huma magħmula minn materjal kemikament inert. Dawn għandhom ikunu ta' daqs xieraq b'konformità mal-proċedura użata għall-inkubazzjoni tal-hamrija. i.e. l-inkubazzjoni fil-massa jew bhala serje individwai ta' kampjuni tal-hamrija (ara s-sezzjoni 1.7.1.2). Attenzjoni qawwija għandha tinghata sabiex ikun minimizzat it-telf ta' l-ilma u li jkun imholli l-iskambju tal-gass matul it-test (eż. il-kontenituri tat-test jistgħu ikunu mogħttija b'folja tal-polyethylene mtaqqba). Meta jkunu ittestjati sustanzi volatili, kontenituri li jistgħu ikunu ssiġġilati u li ma jgħaddix gass minnhom għandhom ikunu wżati. Dawn għandhom ikunu ta' daqs li madwar kwart tal-volum tagħhom ikun mimli bil-kampjun tal-hamrija.

Apparat normali tal-laboratorju, inkluż dan li ġej, huwa wżat:

- apparat ta' l-aġitazzjoni: ċelċieka mekkanika jew apparat ekwivalenti;
- ċentrifuga (3 000 g) jew apparat tal-filtrazzjoni (bl-użu tal-karta tal-filtru ħielsa min-nitrat);
- strument ta' sensitività adegwata u tar-riproduċibbiltà għall-analiżi tan-nitrat.

1.6.2. L-għażla u n-numu ta' hamrija

Hamrija wahda hija użata. Il-karatteristiċi rakkommandati tal-hamrija huma kif ġej:

- kontenut tar-ramel: Mhux inqas minn 50 % imma mhux iktar minn 75 %;
- pH: 5,5 - 7,5;
- kontenut tal-karbonju organiku: 0,5 – 1,5 %;
- il-biomassa mikrobjali għandha tkun imkejla (8)(9) u l-pkontenut tal-karbonju tagħha għandu jkun ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali tal-hamrija.

F'bosta każi, hamrija b'dawn il-karatteristiċi tirrapreżenta l-għar każ ta' sitwazzjoni, la darba l-adsorbazzjoni tal-kimika tat-test hija l-minimu u d-disponnabbiltà tagħha lejn il-mikroflora hija l-massimu. B'konsegwenza, it-testijiet b'hamrija oħra huma, ġeneralemnt, mhux meħtieġa. B'dana kollu, f'ċerti ċirkostanzi, eż. meta l-użu maġġuri antiċipat tas-sustanza tat-test f'hamrija partikolari, bhal ma huma l-hamrija aċiduża tal-foresti, jew għal kimiċi ikkargati elettrostatikament, jista jkun meħtieġ li tintuża hamrija addizzjonali.

▼B**1.6.3. Il-ġbir u l-ħażna tal-kampjunu tal-ħamrija****1.6.3.1. *Il-ġbir***

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-ġhalqa minn fejn il-ħamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġitali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Is-sit magħżul għall-ġbir tal-ħamrija għandu jkun wiehed li jippermetti użu f'terminu twil. Merġhat permanenti, għelieqi b'uċuħ annwali taċ-ċereali (apparti mill-qamh-ir-rum) jew dawk mogħtija d-demel b'zerġhat iffullata, huma tajbin. Il-ġhażla tas-sit tal-kampjunar m'għandhiex tkun giet trattata bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ għam mill-anqas sena qabel il-kampjunar. Ukoll, l-ebda fertilizzant organiku ma jkun gie applikat għal mill-anqas sitt xhur. L-użu ta' fertilizzant minerali huwa aċċettabbli biss meta, b'konformità mal-ħtiġiet tal-kampjuni ta' l-uċuħ u tal-ħamrija, m'għandhomx ikunu miġbura għal mill-anqas tlett xhur wara l-applikazzjoni tal-fertilizzant. L-użu ta' ħamrija trattata bil-fertilizzanti li għandhom effetti bijoċidali magħrufa (eż. is-sijanamid tal-kalċju) għandu jkun evitat.

Il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (itwal minn 30 jum) ta' nixfa jew ta' stgħadir bl-ilma. Għal ħamrija mahruta, il-kampjuni għandhom jingabru minn fond ta' 1 sa 20 cm l-isfel. Għall art tal-merġha (art fil-ħaxix) jew ħamrija oħra meta l-ħrit ma jsehhx matul perijodi twal (f'mill-anqas staġun wiehed tat-tkabbir), il-fond massimu tal-kampjunar jista jkun kemm xejn aktar minn 20 cm (eż. sa 25 cm).

Il-kampjuni tal-ħamrija għandhom ikunu trasportati bl-użu ta' kontenituri u skond kondizzjonijiet tat-temperatura li jggarantixxu li l-propjertajiet inizjali tal-ħamrija ma jkunux sinifikament mibdula.

1.6.3.2. *Ħażna*

L-użu ta' ħamrija miġbura friska mill-għelieqi huwa ippreferut. Jekk ħażna fil-laboratorju ma tistgħax tkun evitata, il-ħamrija tista tkun mahżuna fid-dlam 4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur. Matul il-ħażna tal-ħamrija, il-kondizzjonijiet erobiċi għandhom ikunu assigurati. Jekk il-ħamrija tkun miġbura minn żoni ta' fejn din tkun iffriżata għal mill-anqas tlett xhur tas-sena, il-ħażna għal sitt xhur fi -18 °C sa -22 °C tista tkun ikkonsidrata. Il-biomassa mikrobjali tal-ħamrija mahżuna hija mkejla qabel kull esperiment u l-karbonju fil-biomassa għandu jkun mill-anqas 1 % tal-kontenut totali tal-karbonju organiku fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.2).

1.6.4. Tqandil u l-Preparazzjoni tal-Ħamrija għat-Test**1.6.4.1. *Preinkubazzjoni***

Jekk il-ħamrija kienet mahżunha (ara s-sezzjoni 1.6.3.2), preinkubazzjoni hija rakkomandata għal perijodu ta' bejn 2 u 28 jum. It-temperatura u l-umidità tal-kontenut tal-ħamrija matul il-preinkubazzjoni għandhom ikunu simili għal dik użata fit-test (ara s-sezzjonijiet 1.6.4.2 u 1.7.1.3).

▼B**1.6.4.2. *Karatteristiċi fiżiko-kimiċi***

Il-hamrija hija manwalment innaddfa minn oġġetti kbar (eż. ġebel, partijiet ta' pjanti, eċċ.) u imbagħad magħrbla fin-nieda mingħajt tnixxif eċċessiv lejn daqs ta' partiċelli ta' anqas minn jew egwali għal 2 mm. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjun tal-hamrija għandu jkun aġġustat b'ilma distillat jew dejonizzat lejn valur ta' bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma.

1.6.4.3 *Amendi b'substrata organika*

Il-hamrija għandha tkun emendata b'substrata organika xierqa, eż. tghasida mrammla luċerna-haxix-hadranija (il-komponent ewlieni: *Medicago sativa*) b'relattività C/N ta' bejn 12/1 u 16/1. Ir-relattività rakkommandata tal-hamrija luċerna hija ta' 5 g luċern kull kilogramma ta' hamrija (piz xott).

1.6.5. *Preparazzjoni tas-sustanza tat-test għall-applikazzjoni mal-hamrija*

Is-sustanza tat-test hija normalment applikata bl-użu ta' trasportatur. It-trasportatur jista' jkun ilma (għal sustanzi li jinhallu fl-ilma) jew solidu inert bħal ma huwa ramel fin tal-kwartz (daqs tal-partiċella: 0,1 - 0,5 mm). Trasportaturi likwidi apparti mill-ilma (eż. solventi organiċi bħal ma huma l-aċetun, il-kloroforma) għandhom ikunu evitati la darba dawn jistgħu joħolqu ħsara għall-mikroflora. Jekk ir-ramel ikunu użat bħala trasportatur, dan jista' jkun m'ikun iksi bis-sustanza tat-test imdewba jew sospiza f'solvent xieraq. F'tali każi, is-solvent għandu jkun imneħħi bl-evaporazzjoni qabel it-tahlit mal-hamrija. Għall-aħjar distribuzzjoni tas-sustanza tat-test fil-hamrija, relattività ta' 10 g ramel ma kull kilogramma ta' hamrija (piz xott) huwa rakkommandabbli. Kampjuni tal-kontroll huma ittrattati b'am-mont ekwivalenti ta' ilma u/jew ramel kwartz biss.

Meta jkunu ittestjati kemikali volatili, it-telf matul it-trattament għandu jkun evitat sa kemm dan ikun possibbli u tentattiv għandu jsir sabiex tkun assigurata distribuzzjoni omoġenja fil-hamrija (eż. is-sustanza tat-test għandha tkun injettata fil-hamrija minn diversi postijiet).

1.6.6. *Konċentrazzjonijiet tat-test*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas żewġ konċentrazzjonijiet għandhom ikunu wżati. Il-konċentrazzjoni l-baxxa għandha tirrifletti mill-anqas l-ammont massimu mistenni li jilhaq il-hamrija waqt kondizzjonijiet prattiċi, fil-waqt li l-konċentrazzjoni l-għolja għandha tkun mutiplu tal-konċentrazzjoni l-baxxa. Il-konċentrazzjonijiet ta' sustanza tat-test miżjuda mal-hamrija huma kkalkolati billi tkun preżunta inkorporazzjoni uniformi sa fond ta' 5 cm u l-massa tal-hamrija f'densità ta' 1.5. Għall-agrokimiċi li huma applikati direttament mal-hamrija, jew għal kimiċi li dwarhom il-kwantità li tilhaq il-hamrija tista' tkun prevista, il-konċentrazzjonijiet tat-test irrakkommandati huma l-massimu Predicted Environmental Concentration (PEC) (Konċentrazzjoni Ambjentali Mbassra) u hames darbiet dik il-konċentrazzjoni. Is-sustanzi li huma mistennija li jkunu applikati diversi drabi mal-hamrija fi staġun wieħed għandhom ikunu ittestjati fil-konċentrazzjonijiet derivati mill-multiplikazzjoni tal-PEC bin-numru massimu antiċipat ta' l-applikazzjonijiet. L-għojla konċentrazzjoni ittestjata, b'dana kollu, m'għandhiex teċċedi għaxar darbiet il-massimu tar-rata ta' applikazzjoni waħda. Jekk dawh li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, serje ġeometrikuta' mill-anqas hames konċentrazzjonijiet għandu jkun użat. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda meħtieġa tal-valuri EC_x.

▼B

1.7. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.7.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**1.7.1.1. *It-trattament u l-kontroll*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża fi tlett porzjonijiet ta' piż egwali. Żewġ porzjonijiet huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih il-prodott, u l-iehor huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-prodott (kontroll). Minimu ta' tliet repliki kemm għall-ħamrija ittrattata u wkoll mhux ittrattata huma rakkommandati. Jekk daww li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża f'sitt porzjonijiet ta' piż egwali. Hamsa mill-kampjunu huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih is-sustanza tat-test, u s-sitt kampjun huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-kimika. Tlett replikati taż-żewġ trattamenti u tal-kontroll huma rakkommandati. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assicurata distribuzzjoni omoġenja tas-sustanza tat-test fil-kampjunu tal-ħamrija ittrattata. Matul it-tahlit, l-ikkum-pattjar jew gerbubi mgħaqda għandhom ikunu evitati.

1.7.1.2. *L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija tista' titwettaq b'żewġ modi: Bħala kampjuni fil-massa ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata jew f'serje ta' sub-kampjuni individwali u ta' daqs egwali ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata. B'dana kollu, meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali. Meta l-ħamrija tkun inkubata fil-massa, kwantitajiet kbar ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata huma ippreparati u s-sub-kampjuni għall-analiżi huma miġbura kif mehtieg matul it-test. L-ammont inizjalment ippreparat għal kull trattament u kontroll jiddependi mid-daqs tas-sub-kampjuni, in-numru ta' repliki użati għall-analiżi u n-numru massimu antiċipat tad-drabi tal-kampjunar. Il-ħamrija inkubata fil-massa għandha tkun imħallta sewwa qabel is-sub-kampjuni. Meta l-ħamrija hija inkubata f'serje individwali ta' ħamrija, kull ħamrija ittrattata jew mhux trattata fil-massa hija diviża fin-numru mehtieg ta' sub-kampjuni, u dawn huma utilizzati kif mehtieg. Fl-esperimenti ta' meta tnejn jew aktar hinijiet tal-kampjunar jistgħu ikunu antiċipati, sub-kampjuni biż-żejjed għandhom ikunu ippreparati sabiex ikun hemm abbastanza għar-replikati kollha u d-drabi tal-kampjunar kollu. Mill-anqas tlett kampjuni tar-replikati tal-ħamrija tat-test għandhom ikunu inkubati permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi (ara s-sezzjoni 1.7.1.1). Matul it-testijiet kollha, kontenituri xierqa, bi spazju fil-wiċċ suffiċjenti, għandhom ikunu użati sabiex ikunu evitati l-kondizzjonijiet anerobiċi. Meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' sub-kampjuni individwali.

1.7.1.3. *Il-kondizzjonijiet u t-tul tat-testijiet*

It-test huwa mwettaq fid-dlam f'temperatura tal-kamra ta' 20 ± 2 °C. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjuni tal-ħamrija għandu jkun miżmum matul it-test għal bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.4.2) b'medda ta' ± 5 %. Ilma distillat jew deonizzat jista' jkun miżjud kif mehtieg.

It-tul minimu tat-testijiet huwa 28 jum. Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, ir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma mqabbla. Jekk dawn ikunu differenti b'aktar minn 25 % fil-jum 28, it-test jitkompla sakemm differenza egwali għal, jew anqas minn 25 % tkun akkwistata, jew għal massimu ta' 100 jum, liema minnhom ikun l-aqsar. Għal daww li ma humiex agrokimiċi, it-test ikun terminat wara 28 jum. Fil-jum 28, il-kwantitajiet tan-nitrat fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata jew tal-kontroll huma determinati u l-valuri EC_x ikunu ikkalkolati.

▼B**1.7.2. Kampġunaar u analiżi tal-hamrija****1.7.2.1. Kampjunar skedat tal-hamrija**

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-kampjuni tal-hamrija huma analizzati għan-nitrat fil-jiem 0, 7, 14 u 28. jekk test imtawwal ikun mehtieg, aktar kejl għandu jsehh f'intervalli ta' 14-il jum, wara l-jum 28.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas hames konċentrazzjonijiet tat-test huma wżati u l-kampjuni tal-hamrija huma analizzati għan-nitrat fil-bidu (jum 0) u fit-tmiem tal-perijodu ta' l-espożizzjoni (28 jum). Kejl intermedju, eż. fil-jum 7, jista jkun miżjud jekk dan ikun meqjus bħala mehtieg. L-informazzjoni akkwistata fil-jum 28 hija użata għad-determinazzjoni tal-valur EC_x dwar il-kimika. Jekk mixtieq, l-informazzjoni mill-jum 0 tal-kampjuni tal-kontroll jistgħu ikunu wżati sabiex jirraportaw il-kwantità inizjali tan-nitrat fil-hamrija.

1.7.2.2. L-analiżi tal-kampjuni tal-hamrija

L-ammont ta' nitrat iffurmat f'kull replika trattata jew tal-kontroll huwa determinat f'kull waqt tal-kampjunar. In-nitrat huwa estratt mill-hamrija biċ-ċekċik tal-kampjun b'solvent xieraq ta' l-estrazzjoni, eż. tahlita ta' 0,1 M klorid tal-putassa. Relattività ta' 5 ml tat-tahlita KC1 kull gramma piż xott ekwivalenti tal-hamrija huwa rakkommandat. Sabiex tkun imtejba l-estrazzjoni, il-kontenituri li jkunu bil-hamrija u t-tahlita ta' l-estrazzjoni m'għandhomx ikunu aktar minn nofshom mimlija. It-tahlitiet huma mċekċka fi 150 rpm għal 60 minuta. It-tahlitiet ikunu ċentrifugati jew filtrati u l-fażijiet likwidi huma analizzati għan-nitrat. Estratti likwisi hielsa minn partiċelli jistgħu ikunu maħżuna qabel l-analiżi fi -20 ± 5 °C sa sitt xhur.

2. DATA**2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI**

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'agrokimiċi, il-kwalità yan-nitrat iffurmat f'kull replika tal-kampjun tal-hamrija għandha tkun irregistrata, u l-valuri medji tar-replikati kollha għandhom ikunu ipprovduti f'għamla tabulari. Ir-rati tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu għandhom ikunu evalwati b'metodi xierqa u ġeneralment aċċettabbli (eż. Test-F, 5 % livell sinifikanti). Il-kwantitajiet ta' nitrat iffurmat huma espressi fi mg nitrat/kg piż xott tal-hamrija/kull jum. Ir-rata tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull trattament hija mqabbla ma dik tal-kontroll, u l-persentaġġ tad-devjazzjoni mill-kontroll hija ikkalkolata.

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'dawk li ma humiex agrokimiċi, il-kantità ta' nitrat iffurmat f'kull replika huwa determinat, u l-kurva doża-reazzjoni hija ippreparata għall-estimi tal-valuri EC_x . Il-kwantitajiet ta' nitrat (i.e. mg nitrat/kg piż xottv tal-hamrija) misjuba fil-kampjuni ittrattati wara 28 jum huma mqabbla ma' dak misjun fil-kontroll. Minn din l-informazzjoni, il- % tal-valuri ta' l-inibizzjoni għal kull konċentrazzjoni tat-test huma ikkalkolati. Dawn il-persentaġġi huma mpingija kontra l-konċentrazzjoni, u l-proċeduri statistiċi huma mbagħad użati għall-kalkolu tal-valuri EC_x . Limiti ta' l-affidabilità ($p = 0,95$) għal EC_x ikkalkolati huma wkoll determinati bl-użu tal-proċeduri normali (10) (11) (12).

Is-sustanzi tat-test li jkollhom kwantitajiet għoljin ta' nitroġenu jistgħu jikkontribwixxu għall-kwantitajiet ta' nitrat iffurmat matul it-test. Jekk dawn is-sustanzi huma ttestjati f'konċentrazzjoni għolja (eż. kimika li hija mistennija li tkun użata f'applikazzjonijiet repetuti) kontrolli xierqa għandhom ikunu inkluzi fit-test (i.e. il-hamrija flimkien mas-sustanza tat-test imma minghajr it-tgħasida tal-pjanti). Dettalji minn dawn il-kontrolli għandhom ikunu nkluzi fil-kalkoli tal- EC_x .

▼B**2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI**

Meta r-riżultati mit-testijiet bl-agrokimiċi huma evalwati, u d-differenza fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat bejn it-trattament baxx (i.e. il-massimu tal-konċentrazzjoni prevista) u l-kontroll tkun egwali għal, jew anqas minn 25 % fi kwalunkwe kampjun fil-waqt wara l-jum 28, il-prodott jista jkun evalwat bħala li jkollu infuwenza f'terminu fit-tul fuq it-trasformazzjoni tan-nitroġenu fil-ħamrija. Meta r-riżultati mit-testijiet bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi huma evalwatim il-valuri EC₅₀, EC₂₅ u/jew EC₁₀ huma wżati.

3. RAPPORTAĠĠ

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

Identifikazzjoni sġiġa tal-ħamrija użata, inkluż:

- refernza ġeografika tas-sit (latitudini, longitudini);
- informazzjoni dwar l-istorja tas-sit (i.e. il-koperta veġittiva, it-trattamenti bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ, trattamenti bil-fertilizzanti, kontaminazzjoni aċċidentali, eċċ.);
- is-sekwenza ta' l-użu (eż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.);
- il-fond tal-kampjunar (cm);
- il-kontenut ramel/ħama/tafal (% tal-piż);
- pH (fl-ilma);
- kontenut tal-karbonju organiku (% piż xott);
- kontenut tan-nitroġenu organiku (% piż xott);
- il-konċentrazzjoni inizjali tan-nitrat (mg nitrat kg piż xott);
- kapaċità ta' l-iskambju tal-jonju (mmol/kg);
- biomassa mikrobjali f'termini ta' persentaġġ tal-karbonju organiku totali;
- referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru;
- l-informazzjoni li tirrigwardja il-ġbir u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija;
- Is-sustanza tat-test:

dettalji tal-pri-inkubazzjoni tal-ħamrija, jekk ikun hemm.

- in-natura fiżika u, meta rilevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;
- l-informazzjoni ta' l-identifikazzjoni kimika, meta rilevanti, inkluża l-formula strutturali, il-purità (i.e. għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ il-persentaġġ ta' l-ingredjent attiv), il-kontenut tan-nitroġenu.

Substrata:

- is-sorsi tas-*substrata*
- il-komposizzjoni (i.e. tghasida luċerna, it-tghasida luċerna-haxix-ħdura);
- kontenut tal-karbonju u tan-nitroġenu (% piż xott);
- id-daqs ta' l-imgharbel (mm).

▼B

Kondizzjonijiet tat-test:

- dettalji ta' l-emenda tal-hamrija b'*substrata* organika;
- in-numru tal-konċentrazzjonijiet fil-kimika tat-test użata u, meta xieraq, ġustifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet magħżula;
- dettalji ta' l-applikazzjoni tas-*substrata* tat-test fil-hamrija;
- temperatura ta' l-inkubazzjoni;
- il-kontenut ta' l-umidità fil-bidu u matul it-test;
- il-metodu użat ta' l-inkubazzjoni tal-hamrija (i.e. bħala massa jew bħala serje ta' subkampjuni individwali);
- in-numru ta' replikati;
- id-drabi tal-kampjuna;
- Riżultati:

il-metodu użat għall-estrazzjoni tan-nitrat mill-hamrija.

- proċedura analitika u l-apparat użat fl-analiżi tan-nitrat;
- dettalji tabulati, inklużi il-valuri individwali u medji għall-kejl tan-nitrat;
- il-varjazzjoni bejn ir-replikati fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll;
- spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet imwettqa fil-kalkoli, jekk relevanti;
- il-varjazzjoni perċentwali fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull waqt tal-kampjunar, jekk xieraq, il-limitu ta' l-affidabbiltà tal-valur EC_{50} b'95 fil-mijja affidabbiltà, EC_x oħrajn (i.e. EC_{25} jew EC_{10}) b'intervalli ta' l-affidabbiltà, u grafika tal-kurva doża-reazzjoni;
- riżultati statistiċi tat-trattament;
- l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jkunu ta' għajjnuna fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.

▼B

- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18-20 janvier 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass -Part 1: Substrateinduced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass -Part 2: Fumigationextraction method.
- (10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New - York.
- (12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.



C.22. **MIKROORGANIŻMI TAL-HAMRIJA: TEST TAT-TRASFORMAZZJONI TAL-KARBONJU**

1. **METODU**

Dan il-metodu huwa dupplikazzjoni għal OECD TG 217 (2000)

1.1. **INTRODUZZJONI**

Dan il-Metodu tat-testijiet jiddeskrivi metodu tal-laboratorju iddisnjat sabiex jinvestiga l-effetti potenzjoni f'terminu fit-tul ta' espożizzjoni singola tal-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ u possibbilment kemikali oħrajn fuq l-attività tat-trasformazzjoni tal-karbonju f'mikroorganiżmi tal-hamrija. It-test huwa prinċipalment ibbażat fuq ir-rakkommandazzjonijiet ta' l-Organizzazzjoni għall-Protezzjoni tal-Pjanti Ewropej u tal-Mediterran (1). B'dana kollu, Linji ta' Gwida oħrajn, inklużi dawk tal-Biologische Bundesanstalt tal-Ġermanja (2), il-US Environmental Protection Agency (3) il-SETAC (4), kienu wkoll meqjusa. Laqgħa ta' Hidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Hamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (5) qablet dwar in-numru u t-tip ta' hamrija għall-użu f'dan it-test. Rakkommandazzjonijiet għall-gbir, tqandil u l-ħażna tal-kampjun tal-hamrija huma ibbażati fuq Dokument ta' Gwida ISO (6) u r-rakkommandazzjonijiet tal-Laqgħa ta' Hidma ta' Belgirate.

Fl-assaġġ u l-evalwazzjoni tal-karatteristiċi tossiċi tas-sustanzi tat-test, determinazzjoni ta' l-effetti fuq l-attività mikrobjali tal-hamrija tista tkun mehtieġa, eż., meta l-informazzjoni dwar l-effetti potenzjali min-naħa tal-protezzjoni tal-prodotti ta' l-uċuħ fuq il-mikroflora tal-hamrija huma mehtieġa jew meta l-espożizzjoni ta' mikroorganiżmi tal-hamrija lejn kimiċi appartati milli l-prodotti tal-protezzjoni tal-hamrija, jkunu mistennija. It-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa mwettaq sabiex jiddetermina l-effetti ta' tali kimiċi fuq il-mikroflora tal-hamrija. Jekk l-agrikimiċi (eż., il-prodotti tal-protezzjoni tal-hamrija, l-fertilizzanti, u l-kimiċi tal-foresterija) huma ittestjati, kemm it-trasformazzjoni tan-nitroġenu u wkoll it-testijiet tat-trasformazzjoni tal-karbonu, huma mwettqa. Jekk dawk li ma humiex l-agrokimiċi huma ittestjati, it-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu huwa suffiċjenti. B'dana kollu, jekk il-valuri EC50 tat-test tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu għal tali kimiċi jidhol fi hdan il-medda misjuba għal inibituri tan-nitrifikazzjoni kummerċjalment disponibbli (eż. nitrapyrim), test tat-trasformazzjoni tal-karbonu jista jkun imwettaq sabiex tkun akkwistata aktar informazzjoni.

Il-hamrija tikkonsisti minn komponenti hajjin u mhux-hajjin li jeżistu f'taħlittiet kumplessi u eterogeni. Il-mikroorganiżmi għandhom parti ta' rwol impoṡtanti fit-tfarrik u t-traformazzjoni tal-meterja organika f'hamrija fertili b'ħafna speċi jikkontribwixxu għal diversi aspetti tal-fertilità tal-hamrija. Kwalunkwe interferenza fit-tul ma' dawn il-proċessi bijokimiċi jista' jkollha l-potenzal li tinterferixxi maċ-ċiklu tan-nutrient u dan jista jibdel il-fertilità tal-hamrija. It-trasformazzjoni tal-karbonju u n-nitroġenu sseħħ fil-hamrija fertili kollha. Għalkemm il-kommunitajiet mikrobjali responsabbli għal dawn il-proċessi jiddifferixxu bejn hamrija u oħra, il-mezzi tat-trasformazzjoni huma essenzjalment l-istess.

▼B

Dan il-Metodu ta' Testijiet kif deskritt huwa iddisinjat sabiex jiżvela l-effetti ħżiena ta' terminu fit-tul ta' sustanza dwar il-proċess tat-trasformazzjoni tan-nitroġenu f'hamrija erobika tal-wiċċ. It-test huwa sensitiv għal kambju fid-daqs u l-attività tal-komunitajiet mikrobjali responsabbli għat-trasformazzjoni tal-karbonju la darba jissuġġetti dawn il-komunitajiet kemm lejn l-impenn kemikali u wkoll għal nuqqas gravi ta' karbonju. Hamrija mramma baxxa f'materja organika hija użata. Din il-hamrija hija ittrattata bis-sustanza tat-test u inkubata permezz tal-kondizzjonijiet li jippermettu mataboliżmu mikrobjali mhaffef. Permezz ta' dawn il-kondizzjonijiet, sorsi ta' karbonju faċilment disponibbli fil-hamrija huma malajr eżawriti. Dan jikkawna skarrezza tal-karbonju li kemm jiqtol iċ-ċelloli mikrobjali u wkoll jinduċi rqaq u/jew sporlazzjoni. Jekk it-test ikun imwettaq għal aktar minn 28 jum, is-somma ta' dawn ir-reazzjonijiet tista tkun imkejla bi (hamrija mhux trattata) kontrolli bhala telf progressiv tal-biomassa mikrobjali metabolikament attiva (7). Jekk il-biomassa tal-hamrija m'cahda mill-karbonju, skond il-kondizzjonijiet tat-test, hija affettwata bil-prezenza ta' kimika, jista jkun il-każ li din ma tergal lura lejn l-istess livell bhal fil-kontroll. Għalhekk, disturnazi ikkawunati bis-sustanza tat-test fi kwalunkwe hin matul it-test ta' spiss iddum sat-tmiem tat-test.

It-testijiet li minnhom dan il-metodu ta' testijiet kien gie żviluppat kien primarjament iddisinjati għal sustanzi li dwarhom l-ammont li jilhaq il-hamrija setgħa jkun anticipat. Dan hu l-każ, per eżempju, għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ li dwarhom ir-rata ta' l-applikazzjoni fl-għelieqi hija magħrufa. Għall-agrokimiki, it-testijiet ta' żewġ dozi rilevanti għar-rata anticipata jew imbassa ta' l-applikazzjoni huma suffiċjenti. L-agrokimiċi jistghu ikunu ittestjati bhala ingredjenti attivi (a.i.) jew prodotti formulati. B'dana kollu, it-test mhux limitat għall-kimiċi b'konċentrazzjonijiet ambjentali prevedibbli. Bit-tibdil kemm ta' l-ammonti tas-sustanza tat-test applikata fil-hamrija, u l-mod ta' kif l-informazzjoni hija evalwata, it-test jista wkoll ikunu wżat għal kimiċi li dwarhom l-ammont mistenni li jilhaq il-hamrija ma jkunx magħruf. Għalhekk, bil-kimiċi apparti milli l-agrokimiċi, l-effetti ta' serje ta' konċentrazzjonijiet dwar it-trasformazzjoni tal-karbonju, huma determinati. L-informazzjoni minn dawn it-testijiet hija użata sabiex tipprepara l-kurva tad-doża-reazzjoni u tikkalkola l-valuri EC_{50} , meta hija definita bhala % effett.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Trasformazzjoni tal-karbonju: Hija d-degradazzjoni minn mikroorganizi ta' materja organika li tiffirma il-prodott aħhari inorganiku tad-diossidu tal-karbonju.

EC_x (Konċentrazzjoni Effettiva): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hamrija li tirriżulta fi x persentaġġ inibizzjoni tat-trasformazzjoni tal-karbonju lejn diossidu tal-karbonju.

EC_{50} (Konċentrazzjoni Effettiva Medjana): Hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-hamrija li tirriżulta fi 50 fil-mijja inibizzjoni tat-trasformazzjoni tal-karbonju lejn diossidu tal-karbonju.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Xejn

▼B**1.4. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST**

Il-hamrija maghrbla hija jew ittrattata bis-sustanza tat-test jew imhol-
lija mhux ittrattata (kontroll). Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati,
minimu ta' żewġ konċentrazzjonijiet tat-test huma rakkommandati u
dawn għandhom ikunu magħżula b'reazzjoni ma l-ghola konċentraz-
zjoni antiċipata fl-għalqa. Wara 0, 7, 14 u 28 jum ta' inkubazzjoni,
kampjuni ta' hamrija ittrattata u tal-kontroll huma mħallta bil-
glukożju, u r-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju huma mkejla
għal 12-il siegħa konsekuttivi. Ir-rate tar-respirazzjoni huma espressi
bħala diossidu tal-karbonju rilaxxat (mg diossidu tal-karbonju/kd
hamrija xotta/fis-siegħa) jew ossiġenu ikkunsmat (mg ossiġenu/kg
hamrija/siegħa). Ir-rata medja tar-respirazzjoni fil-kampjuni tal-
hamrija ittrattata hima mqabbla ma dik fil-kontroll u d-devjazzjoni
perċentwali tal-hamrija ittrattata minn dik tal-kontroll hija ikkalkolata.
It-testijiet kollha jkunu mill-anqas ta' 28 jum. Jekk, fit-28 jum, id-
differenzi bejn il-hamrija ittrattata u dik mhux ittrattata huma egwali
jew akbar minn 25 %, il-kejl jitkompla sa massimu ta' 100 jum. Jekk
kimiċi oħrajn appartgħi l-agrokimiċi huma ittestjati, serje ta'
konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test huma miżjuda mal-kampjuni
tal-hamrija, u r-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju (i.e. il-medja
tal-kwantitajiet tad-diossidu tal-karbonju iffurmat jew l-ossiġenu
ikkunsm, at) huma imkejja wara 28 jum. Ir-riżultati mit-testijiet b'kon-
ċentrazzjonijiet multipli huma analizzati bl-użu ta' mudell regressiv, u
l-valuri EC_x huma kkalkolati (i.e. EC_{50} , EC_{25} u/jew EC_{10}). Ara defi-
nizzjonijiet.

1.5. IL-VALIDITÀ TAT-TEST

L-evalwazzjonijiet tar-riżultati tat-test ma l-agrokimiċi huma bbażati
fuq relattivament differenzi żgħar (i.e. medja ta' valur ± 25 %) bejn il-
konċentrazzjonijiet nitriċi fil-hamrija tal-kontroll u f'dik ittrattata,
għalhekk varjazzjonijiet kbar fil-kontrolli jistgħu iwasslu għal riżultati
fofoz. Għalhekk, il-varjazzjoni bejn kampjuni mgedda tal-kontroll
għandha tkun ta' anqas minn ± 15 %.

1.6. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**1.6.1. Apparat**

Il-kontenituri tat-test użati huma magħmula minn materjal kemika-
ment inert. Dawn għandhom ikunu ta' daqs xieraq b'konformità
mal-proċedura użata għall-inkubazzjoni tal-hamrija. i.e. l-inkubazzjoni
fil-massa jew bħala serje individwai ta' kampjuni tal-hamrija (ara s-
sezzjoni 1.7.1.2). Attenzjoni qawwija għandha tingħata sabiex ikun
minimizzat it-telf ta' l-ilma u li jkun imholli l-iskambu tal-gass matul
it-test (eż. il-kontenituri tat-test jistgħu ikunu mogħtija b'folja tal-
polyethylene mtaqqba). Meta jkunu ittestjati sustanzi volatili, konte-
nituri li jitgħu ikunu issiġġillati u li ma jgħaddix gass minnhom
għandhom ikunu wżati. Dawn għandhom ikunu ta' daqs li madwar
kwart tal-volum tagħhom ikun mimli bil-kampjun tal-hamrija.

Għad-determinazzjoni tar-respirazzjoni indotta mill-glukożju, sistemi
ta' inkubazzjoni u strumenti għall-kejl tal-produzzjoni tad-diossidu tal-
karbonju jew tal-konsum ta' l-ossiġenu huma meħtieġa. Eżempji ta'
tali sistemi u strumenti huma misjuba fil-letteratura (8) (9) (10) (11).

1.6.2. L-għażla u n-numu ta' hamrija

Hamrija wahda hija użata. Il-karatteristiċi rakkommandati tal-hamrija
huma kif ġej:

— kontenut tar-ramel: Mhux inqas minn 50 % imma mhux iktar
minn 75 %.

▼B

— pH: 5,5-7,5;

— kontenut tal-karbonju organiku: 0,5-1,5 %;

— il-biomassa mikrobjali għandha tkun imkejla (12)(13) u l-pkontenut tal- karbonju tagħha għandu jkun ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali tal- hamrija.

F'bosta każi, hamrija b'dawn il-karatteristiċi tirrapreżenta l-għar każ ta' sitwazzjoni, la darba l-adsorbazzjoni tal-kimika tat-test hija l-minimu u d-disponnabbiltà tagħha lejn il-mikroflora hija l-massimu. B'konsewvenza, it-testijiet b'hamrija oħra huma, ġeneralemnt, mhux meħtieġa. B'dana kollu, f'ċerti ċirkostanzi, eż. meta l-użu maġġuri anticipat tas- sustanza tat-test f'hamrija partikolari, bħal ma huma l-hamrija aċiduża tal-foresti, jew għal kimiċi ikkargati elettrostatikament, jista' jkun meħtieġ li tintuża hamrija addizzjonali.

1.6.3. Il-ġbir u l-ħażna tal-kampjunu tal-hamrija

1.6.3.1. *Il-ġbir*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-hamrija tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġitali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, zidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Is-sit magħżul għall-ġbir tal-hamrija għandu jkun wiehed li jippermetti użu f'terminu twil. Merġat permanenti, għelieqi b'uċuħ annwali taċ-ċereali (apparti mill-qamħ-ir-rum) jew daww mogħtija d-demel b'zerġat iffullata, huma tajbin. Il-għażla tas-sit tal-kampjunar m'għandhiex tkun ġiet trattata bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ għam mill-anqas sena qabel il-kampjunar. Ukoll, l-ebda fertilizzant organiku ma jkun ġie applikat għal mill-anqas sitt xhur. L-użu ta' fertilizzant minerali huwa aċċettabbli biss meta, b'konformità mal-ħtiġiet tal-kampjuni ta' l-uċuħ u tal-hamrija, m'għandhomx ikunu miġbura għal mill-anqas tlett xhur wara l-applikazzjoni tal-fertilizzant. L-użu ta' hamrija trattata bil-fertilizzanti li għandhom effetti bioċidali magħrufa (eż. is-sijanamid tal-kalċju) għandu jkun evitat.

Il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (itwal minn 30 jum) ta' nixfa jew ta' stgħadir bl-ilma. Għal hamrija mahruta, il-kampjuni għandhom jingabru minn fond ta' 1 sa 20 cm l-isfel. Għall-art tal-merġa (art fil-haxix) jew hamrija oħra meta l-hrit ma jsehhx, atul perijodi twal (f'mill-anqas staġun wiehed tat-tkabbir), il-fond massimu tal-kampjunar jista' jkun kemm xejn aktar minn 20 cm (eż. sa 25 cm). Il-kampjuni tal-hamrija għandhom ikunu ittrasportati bl-użu ta' kontenituri u skond kondizzjonijiet tat-temperatura li jggarantixxu li l-propjetajiet inizjali tal-hamrija ma jkunus sinifikament mibdula.

1.6.3.2. *Hażna*

L-użu ta' hamrija miġbura friska mill-għelieqi huwa ippreferut. Jekk hażna fil-laboratorju ma tistgħax tkun evitata, il-hamrija tista' tkun maħżuna fid-dlam 4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur. Matul il-hażna tal-hamrija, il-kondizzjonijiet erobiċi għandhom ikunu assigurati. Jekk il-hamrija tkun miġbura minn żoni ta' fejn din tkun iffrizata għal mill-anqas tlett xhur tas-sena, il-hażna għal sitt xhur fi -18 °C tista' tkun ikkonsiderata. Il-biomassa mikrobjali tal-hamrija maħżuna hija mkejla qabel kull esperiment u l-karbonju fil-biomassa għandu jkun mill-anqas 1 % tal-kontenut totali tal-karbonju organiku fil-hamrija (ara s-sezzjoni 1.6.2).

▼B**1.6.4. Tqandil u l-preparazzjoni tal-hamrija għat-test****1.6.4.1. Pre-inkubazzjoni**

Jekk il-hamrija kienet mahzunha (ara s-sezzjoni 1.6.4.2 u 1.7.1.3), pre-inkubazzjoni hija rakkommandata għal perijodu ta' bejn 2 u 28 jum. It-temperatura u l-umidità tal-kontenut tal-hamrija matul il-pre-inkubazzjoni għandhom ikunu simili għal dik użata fit-test (ara s-sezzjonijiet 1.6.4.2 u 1.7.1.3).

1.6.4.2. Karatteristiċi fiżiko-kimiċi

Il-hamrija hija manwalment imnaddfa minn oġġetti kbar (eż. ġebel, partijiet ta' pjanti, eċċ.) u imbagħad magħrbla fin-nieda mingħajt tnixxif eċċessiv lejn daqs ta' partiċelli ta' anqas minn jew egwali għal 2 mm. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjun tal-hamrija għandu jkun agġustat b'ila distillat jew dejonizzat lejn valur ta' bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma.

1.6.5. Preparazzjoni tas-sustanza tat-test għall-applikazzjoni mal-hamrija

Is-sustanza tat-test hija normalment applikata bl-użu ta' trasportatur. It-trasportatur jista' jkun ilma (għal sustanzi li jinhallu fl-ilma) jew solidu inert bħal ma huwa ramel fin tal-kwartz (daqs tal-partiċella: 0,1 - 0,5 mm). Trasportaturi likwidi apparti mill-ilma (eż. solventi organiċi bħal ma huma l-aċetun, il-kloroforma) għandhom ikunu evitati la darba dawn jistgħu jgħolqu hsara għall-mikroflora. Jekk ir-ramel ikunu użat bħala trasportatur, dan jista' jkun m'ikun bis-sustanza tat-test imdewba jew sospiżja f'solvent xieraq. F'tali każi, is-solvent għandu jkun imneħħi bl-evaporazzjoni qabel it-tahlit mal-hamrija. Għall-aħjar distribuzzjoni tas-sustanza tat-test fil-hamrija, relattività ta' 10 g ramel ma kull kilogramma ta' hamrija (piż xott) huwa rakkommandabbli. Kampjuni tal-kontroll huma ittrattati b'ammont ekwivalenti ta' ilma u/jew ramel kwartz biss.

Meta jkunu ittestjati kemikali volatili, it-telf matul it-trattament għandu jkun evitat sa kemm dan ikun possibbli u tentattiv għandu jsir sabiex tkun assicurata distribuzzjoni omogenja fil-hamrija (eż. is-sustanza tat-test għandha tkun injettata fil-hamrija minn diversi postijiet).

1.6.6. Konċentrazzjonijiet tat-test

Jekk il-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ jew kimiċi oħrajn b'konċentrazzjonijiet ambjentali prevedibbli huma ittestjati, mill-anqas żewġ konċentrazzjonijiet għandhom ikunu wżati. Il-konċentrazzjoni l-baxxa għandha tirrifletti mill-anqas l-ammont massimu mistenni li jilhaq il-hamrija waqt kondizzjonijiet prattiċi, fil-waqt li l-konċentrazzjoni l-għolja għandha tkun mutiplu tal-konċentrazzjoni l-baxxa. Il-konċentrazzjonijiet ta' sustanza tat-test miżjuda mal-hamrija huma ikkalkolati billi tkun preżunta inkorporazzjoni uniformi sa fond ta' 5 cm u l-massa tal-hamrija f'densità ta' 1.5. Għall-agrokimiċi li huma applikati direttament mal-hamrija, jew għal kimiċi li dwarhom il-kwantità li tilhaq il-hamrija tista' tkun prevista, il-konċentrazzjonijiet tat-test irrakkommandati huma l-massimu Predicted Environmental Concentration (PEC) (Konċentrazzjoni Ambjentali Mbassra) u hames darbiet dik il-konċentrazzjoni. Is-sustanzi li huma mistennija li jkunu applikati diversi drabi mal-hamrija fi staġun wiehed għandhom ikunu ittestjati fil-konċentrazzjonijiet derivati mill-multiplikazzjoni tal-PEC bin-numru massimu antiċipat ta' l-applikazzjonijiet. L-għoila konċentrazzjoni ittestjata, b'dana kollu, m'għandhiex teċċedi għaxar darbiet il-massimu tar-rata ta' applikazzjoni wahda.

Jekk dawk li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, serje ġeometri-kuta' mill-anqas hames konċentrazzjonijiet għandu jkun użat. Il-konċentrazzjonijiet ittestjati għandhom ikopru l-medda mehtieġa tal-valuri EC_x.

▼B

1.7. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.7.1. **Il-kondizzjonijiet ta' l-espożizzjoni**1.7.1.1. *It-trattament u l-kontroll*

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża fi tlett porzjonijiet ta' piż egwali. Żewġ porzjonijiet huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih il-prodott, u l-iehor huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-prodott (kontroll). Minimu ta' tlett repliki kemm għall-ħamrija ittrattata u wkoll mhux ittrattata huma rakkommandati. Jekk daww li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, il-ħamrija hija diviża f'sitt porzjonijiet ta' piż ugwali. Hmasa mill-kampjunu huma mħallta mat-trasportatur li jkun fih is-sustanza tat-test, u s-sitt kampjun huwa mħallat mat-trasportatur mingħajr il-kimika. Tlett replikati taż-żewġ trattamenti u tal-kontroll huma rakkommandati. Attenzjoni għandha tingħata sabiex tkun assicurata distribuzzjoni omoġenja tas-sustanza tat-test fil-kampjunu tal-ħamrija ittrattata. Matul it-taħlit, l-ikkum-pattjar jew gerbubi mgħaqda għandhom ikunu evitati.

1.7.1.2. *L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija*

L-inkubazzjoni tal-kampjuni tal-ħamrija tista' titwettaq b'żewġ modi: Bħala kampjuni fil-massa ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata jew f'serje ta' subkampjuni individwali u ta' daqs egwali ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata. B'dana kollu, meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' subkampjuni individwali. Meta l-ħamrija tkun inkubata fil-massa, kwantitajiet kbar ta' kull ħamrija ittrattata u mhux trattata huma ippreparati u s-subkampjuni għall-analiżi huma miġbura kif mehtieg matul it-test. L-ammont inizjalment ippreparat għal kull trattament u kontroll jiddependi mid-daqs tas-subkampjuni, in-numru ta' repliki użati għall-analiżi u n-numru massimu antiċipat tal-hinijiet tal-kampjunar. Il-ħamrija inkubata fil-massa għandha tkun imħallta sewwa qabel is-subkampjuni. Meta l-ħamrija hija inkubata f'serje individwali ta' ħamrija, kull ħamrija ittrattata jew mhux trattata fil-massa hija diviża fin-numru mehtieg ta' subkampjuni, u dawn huma utilizzati kif mehtieg. Fl-esperimenti meta tnejn jew aktar drabi tal-kampjunar jistgħu ikunu antiċipati, subkampjuni biż-żejjed għandhom ikunu ippreparati sabiex iqisu ir-replikati kollha u l-waqtiet kollha tal-kampjunar. Mill-anqas tlett kampjuni tar-replikati tal-ħamrija tat-test għandhom ikunu inkubati permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi (ara s-sezzjoni 1.7.1.1). Matul it-testijiet kollha, kontenituri xierqa, bi spazju fil-wiċċ suffiċjenti, għandhom ikunu użati sabiex ikunu evitati l-kondizzjonijiet anerobiċi. Meta sustanzi volatili huma ittestjati, it-test għandu jkun imwettaq biss b'serje ta' subkampjuni individwali.

1.7.1.3. *Il-kondizzjonijiet u t-tul tat-testijiet*

It-test huwa mwettaq fid-dlam f'temperatura tal-kamra ta' 20 ± 2 °C. Il-kontenut ta' l-umidità tal-kampjuni tal-ħamrija għandu jkun miżmum matul it-test għal bejn 40 % u 60 % tal-kapaċità massima taż-żamma ta' l-ilma fil-ħamrija (ara s-sezzjoni 1.6.4.2) b'medda ta' ± 5 %. Ilma distillat jew deonizzat jista' jkun miżjud kif mehtieg.

It-tul minimu tat-testijiet huwa 28 jum. Jekk agrokimiċi huma ittestjati, il-kantitajiet tad-diossidu tal-karbonju rilaxxat jew ta' l-k-ossigenu ikkunsmat fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll huma paragonati. Jekk dawn ikunu differenti b'aktar minn 25 % fil-jum 28, it-test jitkompla sakemm differenza egwali għal, jew anqas minn 25 % tkun akkwistata, jew għal massimu ta' 100 jum, liema minnhom ikun l-aqsar. Għal daww li ma humiex agrokimiċi, it-test ikun terminat wara 28 jum. Fil-jum 28, il-kwantitajiet tan-nitrat fil-kampjuni tal-ħamrija ittrattata jew tal-kontroll huma determinati u l-valuri EC_x ikunu ikkal-kolati.

▼B**1.7.2. Kampġjunaar u analiżi tal-ħamrija****1.7.2.1. Kampjunar skedat tal-ħamrija**

Jekk l-agrokimiċi huma ittestjati, il-kampjuni tal-ħamrija huma analiżati għan-nitrat fil-jiem 0, 7, 14 u 28. jekk test imtawwal ikun meħtieġ, aktar kejl għandu jsehh f'intervalli ta' 14-il jum, wara l-jum 28.

Jekk daww li ma humiex agrokimiċi huma ittestjati, mill-anqas hames konċentrazzjonijiet tat-test huma wżati u l-kampjuni tal-ħamrija huma analiżzati għan-nitrat fil-bidu (jum 0) u fit-tmiem tal-perijodu ta' l-espożizzjoni (28 jum). Kejl intermedju, eż. fil-jum 7, jista jkun miżjud jekk dan ikun meqjus bħala meħtieġ. L-informazzjoni akkwistata fil-jum 28 hija użata għad-determinazzjoni tal-valur EC_x dwar il-kimika. Jekk mixtieq, l-informazzjoni mill-jum 0 tal-kampjuni tal-kontroll jistgħu ikunu wżati sabiex jirraportaw il-kwantità inizjali tan-nitrat fil-ħamrija (12).

1.7.2.2. Kejl tar-rati tar-respirazzjoni indotti mill-glukożju

L-ammont ta' nitrat iffurmat f'kull replika trattata jew tal-kontroll huwa determinat f'kull waqt tal-kampjunar. Il-kampjuni tal-ħamrija huma mħallta ma ammint suffiċjenti ta' glukożju sabiex ihegġegħ reazzjoni immedjata ta' respirazzjoni massima. L-ammont ta' glukożju meħtieġ sabiex ihegġegħ ir-reazzjoni respiratorja massima minn ħamrija partikolari jista jkun determinat b'test preliminarju li jutilizza serje ta' konċentrazzjonijiet ta' glukożju (14). B'dana kollu, għal ħamrija mrammla bi 0,5-1,5 % karbonju organiku, 2 000 mg sa 2 000 mg glukożju kull kg piż tal-ħamrija xotta huwa normalment suffiċjenti. Il-glukożju jistgħa jkun mithun fi trab mar-ramel kwarz nadif (10 gramel/kd piż tal-ħamrija xotta) u imħallta b'mod omoġeniku mal-ħamrija.

Il-kampjuni tal-ħamrija emendata bil-glukożju hija inkubata f'apparat xieraq għall-kejl tar-rati tar-respirazzjoni, jew kontinwament, kull siegħa, jew kull sagħtejn (ara s-sezzjoni 1.6.1) fi 20 ± 2 °C. Id-diossidu tal-karbonju rilaxxat jew l-ossigenu ikkunsmat huwa mkejjejjel għal 12-il siegħa konsekuttivi u l-kejl għandu jibda malajr kemm jista jkun possibbli, i.w. fi żmien 1 sa 2 siegħat wara s-supplement tal-glukożju. Il-kwantitajiet totali tad-diossidu tal-karbonju rilaxxata jew l-ossigenu ikkunsmat matul it-12-il siegħa huma mkejla u r-rati medja tar-respirazzjoni huma determinati.

2. DATA**2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI**

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'agrokimiċi, il-kwalità tad-diossidu tal-karbonju rilaxxat minn, jew l-ossigenu ikkunsmat f'kull replika tal-kampjun tal-ħamrija għandha tkun irregistrata, u l-valuri medji tar-replikati kollha għandhom ikunu ipprovduti f'għamla tabulari. Ir-riżultati għandhom ikunu evalwatu b'metodi statistiċi xierqa u ġeneralment aċċettabbli (eż. Test-F, 5 % livell sinifikanti). Ir-rati tar-respirazzjoni indotti bil-glukożju huma espressi fi mg diossidu tal-karbonju/kd piż tal-ħamrija xotta/siegħa jew mg ossigenu/piż tal-ħamrija xotta/siegħa. Il-medja tar-rata tal-formazzjoni tad-diossidu tal-karbonju jew il-medja tar-rata tal-konsum ta' l-ossigenu f'kull trattament huma mqabbli ma daww tal-kontroll, u d-devjazzjoni perċentwali mill-kontroll hija ikkalakolata.

▼B

Jekk it-testijiet huma mwettqa b'dawk li ma humiex agro kimiċi, il-kantità ta' nitrat iffurmat f'kull replika huwa determinat, u l-kurva doża-reażzjoni hija ippreparata għall-estimi tal-valuri EC_x . Ir-rati tar-respirazzjoni indotta bil-glukożju (i.e. mg diossidu tal-karbonju/kg piż tal-ħamrija xotta.siegħa jew mg ossiġenu/piż tal-ħamrija xotta.siegħa) misjuba fil-kampjuni ittrattati wara 28 jum huma mqabbla ma dawk misjuba fil-kontroll. Minn din l-informazzjoni, il- % tal-valuri ta' l-inibizzjoni għal kull konċentrazzjoni tat-test huma ikkalkolati. Dawn il-persentaġġi huma mpingġija kontra l-konċentrazzjoni, u l-proċeduri statistiċi huma mbagħad użati għall-kalkolu tal-valuri EC_x . Limiti ta' l-affidabbiltà ($p = 0,95$) għal EC_x ikkalkolati huma wkoll determinati bl-użu tal-proċeduri normali (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Meta r-riżultati mit-testijiet bl-agro kimiċi huma evalwati, u d-differenza fir-rati tal-formazzjoni tar-respirazzjoni bejn it-trattament baxx (i.e. il-massimu tal-konċentrazzjoni prevista) u l-kontroll tkun egwali għal, jew anqas minn 25 % fi kwalunkwe kampjun fil-waqt wara l-jum 28, il-prodott jista jkun evalwat bħala li jkollu influwenza f'terminu fit-tul fuq it-trasformazzjoni tal-karbonju fil-ħamrija. Meta r-riżultati minn testijiet b'kimiċi appartati milli l-agro kimiċi huma evalwati, il-Valuri EC_{50} , EC_{25} u/jew EC_{10} huma wżati.

3. RAPPORTAĠĠ

RAPPORTTAT-TEST

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

Identifikazzjoni shiħa tal-ħamrija użata, inkluż:

- referenza ġeografika tas-sit (latitudini, longitudini);
- informazzjoni dwar l-istorja tas-sit (i.e. il-koperta veġittiva, it-trattamenti bil-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ, trattamenti bil-fertilizzanti, kontaminazzjoni aċċidentali, eċċ.);
- is-sekwenza ta' l-użu (eż. ħamrija agrikola, foresta, eċċ.);
- il-fond tal-kampjunar (cm);
- il-kontenut ramel/ħama/tafal (% tal-piż);
- pH (fl-ilma);
- kontenut karbonju organiku (% piż xott);
- kontenut tan-nitroġenu organiku (% piż xott);
- kapaċità ta' l-iskambju tal-jonju (mmol/kg);
- biomassa mikrobjali f'termini ta' persentaġġ tal-karbonju organiku totali;
- referenza għall-metodi użati għad-determinazzjoni ta' kull parametru;
- l-informazzjoni li tirrigwardja il-gbir u l-ħażna tal-kampjuni tal-ħamrija;
- dettalji tal-pri-inkubazzjoni tal-ħamrija, jekk ikun hemm.

▼B

Is-sustanza tat-test:

- in-natura fiżika u, meta relevanti, il-propjetajiet fiżikokimiċi;
- l-informazzjoni ta' l-identifikazzjoni kimika, meta relevanti, inkluża l-formula strutturali, il-purità (i.e. għall-prodotti tal-protezzjoni ta' l-uċuħ il-persentaġġ ta' l- ingredjent attiv), il-kontenut tan-nitroġenu.

Kondizzjonijiet tat-test:

- dettalji ta' l-emenda tal-hamrija b'substrata organika;
- in-numru tal-konċentrazzjonijiet fil-kimika tat-test użata u, meta xieraq, ġustifikazzjoni tal-konċentrazzjonijiet magħżula;
- dettalji ta' l-applikazzjoni tas-substrata tat-test fil-hamrija;
- temperatura ta' l-inkubazzjoni;
- il-kontenut ta' l-umidità fil-bidu u matul it-test;
- il-metodu użat ta' l-inkubazzjoni tal-hamrija (i.e. bħala massa jew bħala serje ta' subkampjuni individwali);
- in-numru ta' replikati;
- id-drabi tal-kampjunar.

Riżultati:

- metodu u apparat użat għall-kejl tar-rati tar-respirazzjoni;
- dettalji tabulate, inklużi l-valuri individwali u medji għall-kwantitajiet tad- diossidu tal-karbonju jew ta' l-ossigenu;
- il-varjazzjoni bejn ir-replikati fil-kampjuni ittrattati u tal-kontroll;
- spjegazzjonijiet tal-korrezzjonijiet imwettqa fil-kalkoli, jekk relevanti;
- il-varjazzjoni perċentwali fir-rati tal-formazzjoni tan-nitrat f'kull waqt tal-kampjunar, jekk xieraq, il-limitu ta' l-affidabbiltà tal-valur EC₅ b'95 fil-mija affidabbiltà, EC_x oħrajn (i.e. EC₂₅ jew EC₁₀) b'intervalli ta' l-affidabbiltà, u grafika tal-kurva doża-reazzjoni;
- trattament statistiku tar-riżultati, meta xieraq;
- l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha li jkunu ta' għajjnuna fl-interpretazzjoni tar-riżultati.

4. **REFERENZI**

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in “Pesticide Effects on Soil Microflora”. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.
- (8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in “Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties”. Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A., and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77-81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38: 113-120.
- (15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99-113.
- (16) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (17) Finney D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.



C.23. TRASFORMAZZJONIEROBIKA UANEROBIKA FIL-HAMRIJA

1. METODU

Dan il-Metodu tat-Test huwa replika għal OECD TG 307 (2002)

1.1. INTRODUZZJONI

Dan il-Metodu tat-test huwa ibbażat fuq linji ta' gwida eżistenti (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Dan il-metodu deskritt f'dan il-metodu tat-test huwa iddisinjat għall-evalwazzjoni tat-trasformazzjoni erobika u anerobika tal-kimiċi fil-hamrija. L-esperimenti huma mwettqa sabiex ikun determinat (i) ir-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test, u (ii) in-natura u r-rata tal-formazzjoni u t-tnaqqis tat-traformazzjoni tal-prodotti li dwarhom il-pjanti u l-organizmi fil-hamrija jistgħu ikunu esposti. Tali studji huma meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati fil-hamrija jew li huma pjuttost li jilhqgħu l-ambjent tal-hamrija. Ir-riżultati ta' tali studji fil-laboratorju jistgħu wkoll ikunu wżati sabiex jiżviluppaw il-protokoll tal-kampjunar u ta' l-analiżi fl-oqsma ta' studju relatati.

L-istudji erobiċi u anerobiċi ma tip wiehed ta' hamrija huma generalment suffiċjenti għall-evalwazzjoni tal-passaġġi tat-trasformazzjoni (8) (10) (11). Ir-rati tat-trasformazzjoni għandhom ikunu determinati f'mill-anqas tlett hamrija addizzjonali (8) (10).

Laqgħa ta' Hidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Hamrija/Sediment li nżammiet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (10) qablet dwar in-numru u t-tip ta' hamrija għall-użu f'dan it-test. It-tipi tal-hamrija ittestjati għandhom ikunu rappreżentattivi tal-kondizzjonijiet ambjentali ta' fejn l-użu jew ir-rilaxx ikun sjer isehh. Per eżempju, il-kimiċi jistgħu ikunu rilaxxati fi klimi subtropikali sa tropikali għandhom ikunu ittestjati bil-Ferrasoli jew in-Nitrasoli (sistema FAO). Il-Laqqgħa ta' Hidma kienet ukoll għamlet rakkommandazzjonijiet li jirrigawrjaw il-għir, it-tqandil u l-hażna tal-kampjuni tal-hamrija, ibbażari fuq il-Linja ta' Gwida ISO (15). L-użu tal-hamrija mistgħadra (tar-ross) hija wkoll ikkunsidrata f'dan il-metodu.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Is-sustanza tat-test: Kwalunkwe sustanza, sew jekk kompost oriġinali jew il-prodotti rilevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: Is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni biotiċi jew abiotiċi tas-sustanza tat-test, inklużi il-CO₂ u l-prodotti li huma marbuta mar-residwi.

“Residwi marbuta”: “Residwi marbuta” tirrapreżemnta komposti fil-hamrija, pjanti jew animali, li jippersistu fil-matriċi fil-għamla ta' sustanza oriġinali jew tal-prodotti metaboliti/trasformazzjoni wara l-estrazzjoni. Il-metodu ta' l-estrazzjoni m'għandux sostanzjalment jibdel il-komposti nfushom jew l-istruttura tal-matriċi. In-natura tar-rabta tista tkun kjarifikata parzjalment bil-metodi ta' l-estrazzjoni tat-tibdil-tal-matriċi u b'tekniċi analitiċi sofistikati. Sal-lum, per eżempju, ir-rabtiet kovalenti joniċi u sorptivi, kif ukoll l-ingassar, kienu ġew identifikati b'dan il-mod. Generalment, il-formazzjoni tar-residwi marbuta tnaqqas il-bioaċċessibbiltà u l-biodisponabbiltà sinifikament (12) (Modifikati minn IUPAC 1984 (13)).

Trasformazzjoni erobika: Reazzjonijiet li jseħħu fil-preżenza ta' l-ossigenu molekulari (14).

▼B

Trasformazzjoni anerobika: Reazzjonijiet li jseħhu fl-eskluzjoni ta' l-ossigenu molekulari (14).

Hamrija: Hija tahlita ta' kostitwenti kimiċi minerali u organiċi, dawn ta' l-aħħar ikun fihom komposti ta' kontenut għoli tal-karbonju u n-nitroġenu u ta' pizijiet molekulari għoljin, animali b'organizmi żgħat (l-aktar mikro-). Il-hamrija tista tkun imqandla f'zewġ stati:

- (a) mhux disturbata, kif tkun żviluppat matul iż-żmien, f'saffi karatteristiċi tat-tipi tal-varjetà tal-hamrija;
- (b) disturbata, kif normalment tinsab f'għelieqi harratija jew kif isseħh meta l-kampjuni huma miġbura bit-thaffir u kif użata f'dan il-metodu ta' test (14).

Mineralizzazzjoni: Hija d-degradazzjoni kompleta ta' kompost organiku lejn CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, u CH_4 , CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet anerobiċi. Fil-kuntest ta' dan il-metodu taa' test, meta kompost bit-tikketta- ^{14}C ikun użat, il-mineralizzazzjoni tfisser dehradazzjoni estensiva li matulha atomu tal-karbonu tiikkettjat ikun ossidizzat bil-rilaxx ta' l-ammont xieraq ta' $^{14}\text{CO}_2$ (14).

Nofs-hajja: $t_{0.5}$, huwa l-hin mehtieg għal 50 % trasformazzjoni tas-sustanza tat-test meta t-trasformazzjoni tista tkun deskritta bil-kinetiċi ta' l-ewwel ordni; din hija independenti mill-konċentrazzjoni.

DT₅₀ (Ghibien Hin 50): Huwa l-hin li fih il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqa bi 50 %; din hija differenti min-nofs-hajja $t_{0.5}$ meta t-trasformazzjoni ma tkunx issegwi il-kinetiċi ta' l-ewwel ordni.

DT₇₅ (Ghibien Hin 75): Huwa l-hin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqa bi 75 %.

DT₉₀ (Ghibien Hin 90): Huwa l-hin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqa bi 90 %.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu wżati għall-karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti bil-metodi spektroskopici u kromatografici.

1.4. L-APPLIKABBILTÀ TAT-TEST

Il-metodu huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha (mhux ittikkettjati jew radjotikkettjati) li dwarhom metodu analitiku b'eżattezza u sensitività suffiċjenti huma disponibbli. Dan huwa applikabbli għal komposti kemm xejn volatili, mhux volatili, li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. It-test m'għandux ikun applikat lejn kimiċi li huma ferm volatili minn ġewwa l-hamrija (eż., fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistgħux jinżammu fil-hamrija skond il-kondizzjonijiet sperimentali ta' dan it-test.

▼B**1.5. INFORMAZZJONI DWARIS-SUSTANZATAT-TEST**

Sustanza tat-test mhux-ittikkettjata jew ittikkettjata tista tkun użata sabiex tkejjel ir-rata tat-trasformazzjoni. Il-materjal tikkettjat huwa mehtieg għall-istudju tal-passaġġ tat-trasformazzjoni u sabiex ikun stabbilit il-bilanċ tal-massa. Tikkettjar- ^{14}C huwa rakkommandat imma l-użu ta' izotopi oħrajn bħal ma huma ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , jistgħu wkoll ikunu utili. Sa kemm huwa possibbli, it-tikketta għandha tkun imqiegħda fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekolu ⁽¹⁾ (10). Il-Purità tas-sustanza tat-test għandha tkun mill-anqas 95 %.

Qabel ma jitwettaq test dwar it-trasformazzjoni eronika u amerobika fil-hamrija, l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test għandha tkun disponibbli.

- (a) solubilità fl-ilma (il-Metodu A.6);
- (b) solubilità f'solventi organiċi;
- (c) pressjoni tal-fwar (il-Metodu A.4) u l-ligi kostanti Henry;
- (d) il-koeffiċjent tal-qsim n-oktano/ilma (il-Metodu A.8);
- (e) stabbilità kimika fid-dlam (idrolisi) (il-Metodu C.7);
- (f) pKa jekk il-molekolu jkun probabbli għal protonazzjoni jew deportonazzjoni (OECD Linja ta' Gwida 112) (16).

Informazzjoni utili oħra tista tinkludi dettalji dwar it-tossicità tas-sustanza tat-test fuq il-mikro-organizmi tal-hamrija (il-Metodi tat-Testijiet C.21 u C.22) (16).

Il-metodi analitiċi (inklużi l-metodi ta' l-estrazzjoni u tat-tindif) għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tat-traformazzjoni tal-prodotti tagħha, għandhom ikunu disponibbli.

1.6. IL-PRINĊIPJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-kampjuni tal-hamrija huma ittrattati bis-sustanza tat-test u inkubati fid-dlam f'garafini tat-tip biometriċi jew f'sistemi ta' nixxija kontinwa skond il-kondizzjonijiet kontrollati tal-laboratorju (f'temperatura u l-umidità tal-hamrija kostanti). Wara intervalli ta' ħin xieraq, il-kampjuni tal-hamrija huma estratti u analizzati mis-sustanza oriġinali u għall-prodotti tat-trasformazzjoni. Prodotti volatili huma wkoll, miġbura għall-analiżi bl-użu ta' apparati xierqa ta' l-assorbazzjoni. Bl-użu tal-materjal ittikkettjat- ^{14}C , ir-rati varji tal-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test jistgħu ikunu mkejla bin-nassa evoluta $^{14}\text{CO}_2$ u l-bilanċ tal-massa, inkluża l-formazzjoni ta' residwi marbuta mal-hamrija, jistgħu ikunu stabbiliti.

1.7. KRITERJI TAL-KWALITÀ**1.7.1. Irkupru**

L-estrazzjoni u l-analiżi ta', mill-anqas, nofs il-kampjunu duplikati tal-hamrija, wara ż-żieda tas-sustanza tat-test, tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetabbiltà tal-metodu nalitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni għas-sustanza tat-test. L-irkupri fi stadji aktar tard ta' l-esperimenti huma mogħtija bil-bilanċi rispettivi tal-massa. L-irkupri għandhom ikunu fil-medda ta' minn 90 % sa 110 % tal-kimiċi ittikkettjati (8) u minn 70 % sa 110 % għal kimiċi mhux ittikkettjati (3).

⁽¹⁾ Per eżempju, jekk is-sustanza għat-test ikun fiha ċirku wiehed. L-ittikkettjar fuq dan iċ-ċirku huwa mehtieg. Jekk is-sustanza għat-test ikun fiha żewġ ċrieki jew iktar, studji separati jistgħu jkunu mehtieġa biex tiġi evalwata x-xorti ta' kull ċirku ttikkettjat u biex tinkiseb informazzjoni adattata dwar il-formazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni.

▼B**1.7.2. Ir-repettabilità u s-sensittività tal-metodu analitiku**

Ir-repettabilità tal-metodu analitiku (eskluzja l-peffċjenza ta' l-estrazzjoni inizjali) sabiex tkun kwantifikata s-sustanza tat-test u tat-trasformazzjoni tal-prodotti tista tkun verifikata b'analizi dupplikata ta' l-istess estratt tal-hamrija, inkubat għal tul ta' żmien biżżejjed għall-formazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti.

Il-limitu ta' sejbien (limit of detection (LOD)) tal-metodu analitiku għas-sustanza tat-test u għat-trasformazzjoni tal-prodotti għandu jkun mill-anqas 0,01 mg.kg-1 hamrija (bħala sustanza tat-test) jew 1& tad-doża applikata, liema minnhom hija l-anqas. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni (limit of quantification (LOQ)) għandu wkoll ikun speċifikat.

1.7.3. L-eżattezza tad-dettalji tat-trasformazzjoni

Analizi regressiva tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-hin, tagħti informazzjoni xierqa dwar l-affidabbilità tal-kurva tat-trasformazzjoni u tippermetti il-kolkolu tal-limiti affidabbli ta' nofs-hajjiet (fil-każ ta' pseudo kinetiki ta' l-ewwel ordni) jew il-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90} .

1.8. ID-DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**1.8.1. Apparat u reaġenti kimiċi**

Is-sistemi ta' l-inkubazzjoni jikkonsistu minn sistemi statiki magħluqa jew sistemi xierqa ta' nixxija kontinwa (7)(17). Eżempji ta' l-apparat xieraq ta' nixxija kontinwa fil-hamrija u l-garafina tat-tip-biometriku huma murija fil-Fihuri 1 u 2, rispettivament. Iz-żewġ tipi tas-sistemi ta' l-inkubazzjoni għandhom vantaġġi u limitazzjonijiet (7)(17).

Apparat normali tal-laboratorju huwa meħtieġ, u speċjalment dan li ġej:

- Strumenti analitiċi bħal ma huma l-apparat GLC, HPLC, TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' sejbien għall-analizi ta' sustanzi radjo-tikketta jew mhux-tikketta jew metodu tat-trattib ta' l-izotopi inversi;
- Strumenti għall-iskopijiet ta' l-identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);
- Strument ta' l-ġhadd tal-likwidu xintillanti;
- Ossidizzatur għall-kombustjoni tal-materjal radjo-attiv;
- Ċentrifuga;
- Apparat ta' l-estrazzjoni (per eżempju, tubi taċ-ċentrifuga għal estrazzjoni fil-kiesah u apparat Soxhlet għal estrazzjoni kontinwa taht ir-refluss);
- Strumentazzjoni għall-konċentrazzjoni tat-tahlitiet u l-estratti (eż. evaporator rotanti);
- Banju ta' l-ilma;
- Apparat mekkaniku tat-tahlit (eż. maagna li tagħġen, hallati rotanti).

▼B

Ir-reagenti kimiċi użati jinklusu, per eżempju:

- NaOH, grad analitiku, 2 mol. dm⁻³, jew bazi oġra xierqa (eż. KOH, ethanolamine);
- H₂SO₄, grad analitiku, 0,05 mol. dm⁻³;
- Ethylene glycol, grad analitiku;
- aterjali solidi ta' l-assorbazzjoni bħal ma huma l-ġir tas-soder u l-buqi tal-polyurethane;
- Solventi organiċi, grad analitiku, bħal ma hu l-aċetun, il-metanol, eċċ.;
- Likwidu tax-xintillazzjoni.

1.8.2. **L-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Għal zieda ma, u d-distribuzzjoni fil-hamrija, is-sustanza tat-test tista tkun imdewwba fl-ilma (deonizzat jew distillat) jew, meta mehtieg, f'ammonti minimi ta' aċetun jew solventi organiċi oħrajn (6) li fihom is-sustanza tat-test tkun tinhall u stabbli b'mod suffiċjenti. B'dana kollu, l-ammont ta' solvent magħżul m'għandux ikollu influwenza sinifikanti fuq l-attività mikrobjali tal-hamrija (ara s-sezzjonijiet 1.5 u 1.9.2-1.9.3) L-użu ta' solventi li jfixxlu l-attività mikrobjali, bħal ma huma l-kloroform, id-diklorometanju u solventi haloġenizzati oħrajn, għandu jkun evitat.

Is-sustanza tat-test tista wkoll tkun miżjuda bħala solidu, eż. mħallta mar-ramel kwartz (6) jek f'test żgħir ta' sub-kampjun tal-hamrija li tkun giet imnixxa fl-arja u sterilizzata. Jekk is-sustanza tat-test hija miżjuda bl-użu ta' solvent, is-solvent għandu jkun imgħolli li jevapora qabel ma s-sub-kampjun hekk miżjud ikun imhallat mal-kampjun oriġinali mhux-sterili tal-hamrija.

Għal kimiċi ġenerali, li r-rotta magħgura tad-dhul tagħhom fil-hamrija hija matul l-applikazzjoni tal-hama' tad-drenagg/mill-hmieġ ta' l-annimali, is-sustanza tat-test għandha l-ewwel tkun miżjuda mal-hama' li imbagħad tkun miżjuda mal-kampjun tal-hamrija. (ara s-sezzjonijiet 1.9.2 u 1.9.3)

L-użu ta' prodotti formulati mhux, bħala rutina, rakkommandat. B'dana kollu, eż. għal sustanzi tat-test li ma tantx jinhallu, l-użu ta' materjal; formulat jista jkun alternattiva xierqa.

1.8.3. **Il-hamrija**

1.8.3.1. *L-għażla tal-hamrija*

Għad-determinazzjoni tal-passagg tat-trasformazzjoni, hamrija rappreżentattiva tista tkun użata' hamrija grassa mrammla jew hamrija grassa bil-hama' jew hamrija grassa jew ramel grass (skond il-klassifikazzjoni FAO u USDA 18) bi pH ta' 5,5-8,0, kontenut karboniku organiku ta' 0,5-2,5 % u biomassa mikrobjali ta' mill-anqas 1 % tal-karbonju organiku totali hija rakkommandata (10).

Għall-istudji tar-rata tat-trasformazzjoni mill-anqas tlett židiet tal-hamrija għandhom ikunu wżati li jirrapreżentaw medda ta' hamrija relevanti. Il-hamrija għandha tvarja fil-kontenut karboniku organiku, pH, kontenut tat-tafal u l-biomassa mikrobjali (10).

▼B

Il-*hamrija* kollha għandha tkun karatterizzata, mill-anqas, għal tiswir (% *ramel*, % *hama*, % *tafal*) (skond il-klassifikazzjoni FAO u ESDA (18)), pH, *kapaċità ta' skambju tal-jonji*, *karbonju organiku*, *densità tal-massa*, *karatteristiċi taż-żamma ta' l-ilma* [2] ⁽¹⁾ u l-bijomassa mikrobjali (biss għal studju erobiċi). Informazzjoni addizzjonali dwar il-propjetajiet tal-*hamrija* jistgħu ikunu utili fl-interpretazzjoni tar-riżultati. Għad-determinazzjoni tal-karatteristiċi tal-*hamrija*, il-metodi rakkommandati fir-referenzi (19) (20) (21) (22) (23) jistgħu ikunu wżati. Il-bijomassa mikrobjali għandha tkun determinata bl-użu tar-respirazzjoni indotta-fis-sub-strata (*substrate-induced respiration (SIR)*) il-metodu (25) (26) jew metodi alternattivi (20).

1.8.3.2. *Gbir, tqandil, u l-ħażna tal-ħamrija*

L-informazzjoni dettaljata dwar l-istorja tas-sit fl-għalqa minn fejn il-*hamrija* tat-test hija miġburha għandha tkun disponibbli. Id-dettalji jinkludu l-lokalità eżatta, il-kisi veġitali, id-dati tat-trattament bil-prodotti tal-protezzjoni tal-pjanti, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u mhux-organiċi, żidiet ta' materjali bioloġiċi jew kontaminazzjonijiet aċċidentali. Jekk il-*hamrija* tkun giet ittrattata bis-sustanza tat-test jew bl-analogi strutturali tagħha matul l-erba' snin preċedenti, dawn m'għandhomx ikunu użati għall-istudji tat-transformazzjoni (10) (15).

Il-*hamrija* għandha tkun miġbura friska mill-għalqa (mill-orizzont A jew mis-saff tal-wiċċ f'20 cm) b'kontenut ta' l-ilma fil-*hamrija* li jiffaċilita l-għarbiel. Għal *hamrija* ohra apparti milli dik mistgħadra, il-kampjunar għandu jkun evitat matul, jew immedjetament wara, perijodi twal (> 30 jum) ta' nixfa, glata jew mifqugha bl-ilma (14). Il-kampjuni għandhom ikunu trasportati b'maniera li tnaqqas it-tibdiliet fil-kontenut ta' l-ilma fil-*hamrija* u għandhom jinżamm fid-dlam b'aċċess liberu ta' arja, kemm jista' jkun possibbli. Borża tal-plastik, kemm xejn marbuta, hija ġeneralment adekwata għal dan l-iskop.

Il-*hamrija* għandha tkun proċessata malajr kemm jista' jkun possibbli wara l-kampjunar. Veġitazzjoni, fawna kbira tal-*hamrija* u ġebel għandhom ikunu mnehhija qabel ma l-*hamrija* tkun mogħddija minn għarbiel ta' 2 mm li jnehhli ġebel zghar, fawna u l-frak tal-pjanti. Tnixxif estensiv u t-tishiq tal-*hamrija*, qabel l-għarbiel, għandhom ikunu evitati (15).

Meta il-kampjunar fil-għalqa jkun diffiċli fix-xitwa (il-*hamrija* iffriżta jew koperta f'saffi ta' borra), din għandha tingabar mil-*hamrija* tal-lott mahżuna f'serra b'koperta ta' pjanti (eż. *ħaxix* jew *tahlita* ta' *ħaxix* u *silla*) L-istudji bil-*hamrija* miġbura friska mill-għalqa huma ferm preferuti, imma jekk il-*hamrija* miġbura u ipproċessata ikunu tiġi mahżuna qabel il-bidu ta' l-istudju, il-kondizzjonijiet tal-ħażna għandhom ikunu adekwati u biss għal-limitu ta' żmien (4 ± 2 °C għal massimu ta' tlett xhur) sabiex jinżamm l-attività mikrobjali ⁽²⁾ 1. Struzzjonijiet dettaljati dwar il-*gbir*, it-tqandil u l-ħażna tal-*hamrija*, li għandha tkun użata fl-esperimenti tal-biotrasformazzjoni, jistgħu jinstabu fi (8) (10) (15) (26) (27).

⁽¹⁾ Il-karatteristika tar-ritenzjoni ta' l-ilma fil-*hamrija* tista' titkejjel bhala *field capacity*, bhala *kapaċità taż-żamma ta' l-ilma* jew bhala *water suction tension (pF)*. Għall-ispeġġazzjoni ara Anness I. Għandu jiġi r-rappurtat fir-rapport ta-test jekk il-karatteristiċi tar-ritenzjoni ta' l-ilma u d-densità goffa tal-*hamrija* ġew determinati fil-kampjuni ta' l-għelieqi *not disturbed* jew f'kampjuni *disturbed* (proċessati).

⁽²⁾ Recent research results indicate that soils from temperate zones can also be stored at -20 °C for more than three months (28)(29) without significant losses of microbial activity.

▼B

Qabel ma l-ħamrija ipproċessata tkun użata f'dan it-test, din għandha tkun l-ewwel inkubata sabiex tippermetti l-germinazzjoni u t-tneħħija taż-żrieragh, u sabiex ikun stabbilit mill-gdid l-ekwilibriju tal-metaboliżmu mikrobjali bħala segwiment tal-kambju mill-kampjunar jew mill-kondizzjonijiet tal-ħażna lejn il-kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni. Perijodu ta' qabel l-inkubazzjoni ta' bejn 2 u 28 jum, li jqarreb it-temperatura u l-kondizzjonijiet ta' l-umidità tat-test attwali huma ġeneralment adegwati (15). Iż-żmien tal-ħażna u ta' qabel l-inkubazzjoni, flimkien, m'għandhomx jeċċedu t-tlett xhur.

1.9. L-IMĠIEBA TAT-TEST

1.9.1. **Kondizzjonijiet tat-test**1.9.1.1. *Temperatura tat-test*

Matul il-perijodu kollu tat-test, il-ħamrija għandha tkun inkubata fiddlam f'temperatura kostanti li tirrapreżenta l-kondizzjonijiet klimatiċi ta' fejn l-użu jew ir-rilaxx ikun sejjer isehh. Temperatura ta' 20 ± 2 °C hija rakkommandata għas-sustanzi kollha tat-test li jistgħu jilhqgħu t-temperatura klimatika tal-ħamrija. It-temperatura għandha tkun sorveljata.

Dwar il-kimiċi applikati jew rilaxxati fi klimi keshin (eż. pajjiżi tat-tramunta, matul il-perijodi tal-ħarifa/xitwa), kampjuni addizzjonali tal-ħamrija għandhom ikunu inkubati imma f'temperatura aktar baxxa (eż. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Il-kontenut ta' l-umidità*

Għat-testijiet tat-trasformazzjoni permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, il-kontenut ta' l-umidità tal-ħamrija ⁽¹⁾ 2għandu jkun aġġustat lejn u miżmum fi pF bejn 2,0 u 2,5 (3). Il-kontenut ta' l-umidità fil-ħamrija huwa espress bħala massa ta' l-ilma għal kull massa ta' ħamrija xotta u għandu jkun ikkontrollat regolament (eż. f'intervalli ta' ġimghatejn) bl-użin fil-garafini ta' l-inkubazzjoni u t-talf ta' l-ilma kumpensdat biż-żieda ta' l-ilma (preferibbilment ilma tal-vit sterilizzat mill-filtru). Attenzjoni għandha tingħata sabiex ikunu prevenuti jew minimizzati t-telf tas-sustanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni bil-volatilizazzjoni u/jew il-fotodegradazzjoni (jekk ikun hemm) matul iż-żieda ta' l-umidità.

Għat-testijiet tat-trasformazzjoni fil-kondizzjonijiet anerobiċi u mistgħadra, il-ħamrija tkun saturata bl-ilma mfawwar.

1.9.1.3. *Kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni erobika*

Fis-sistimi tan-nixxija kontinwa, il-kondizzjonijiet erobiċi ikunu miżmuma bit-tlaħlil intermittenti jew bil-ventilazzjoni kontinwa b'arja umidifikata. Fil-garafini biometriċi, skambju ta' l-arja jkun miżmum b'diffużjoni.

1.9.1.4. *Kondizzjonijiet erobiċi sterili*

Sabiex tkun akkwistat l-informazzjoni dwar ir-relevanza tat-trasformazzjoni abjotika tas-sustanza tat-test, kampjuni tal-ħamrija jistgħu ikunu sterilizzati (għall-metodi ta' l-isterilizzazzjoni ara r-referenzi 16 u 29), ittrattati bis-sustanza sterili tat-test (eż. zieda ta' tahlita matul filtru sterili) u mogħtija l-arja bl-użu ta' arja sterili umidifikata kif deskritt fis-sezzjoni 1.9.1.3. Għal ħamrija mistgħadra, ħamrija u ilma għandhom ikunu sterilizzati u l-inkubazzjoni għandha tkun imwettqa kif deskritt fis-sezzjoni 1.9.1.6.

⁽¹⁾ Il-ħamrija la għandha tkun imxarrba wisq u lanqas niexfa wisq sabiex tinżamm l-aeration adegwata u n-nutrizzjoni tal-ħamrija *microflora*. Kontenuti ta' umdità rakkomandati għall-medda tat-tkabbir mikrobjali ottimali minn 40-60 % il-kapaċità taz-zamma ta' l-ilma (WHC) u minn 0,1-0,33 bar (6). Il-medda ta' l-aħhar hija ekwivalenti għall-medda pF-ta' 2,0 – 2,5. Il-kontenuti ta' umdità tipiċi ta' tipi varji ta' ħamrija huma mogħtija f'Anness 2.

▼B

1.9.1.5. *Kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni anerobika*

Sabiex ikunu stabbiliti l-kondizzjonijiet anerobiċi, il-hamrija ittrattata mis-sustanza tat-test u unkubata fil-kondizzjonijiet erobiċi għal 30 jum jew għal “nofs-hajja” wahda jew DT_{50} (liema minnhom ikun l-iqsar) hija mbagħad mistgħadra fl-ilma (saff ta' 1-3 cm ilma) u s-sistema ta' l-inkubazzjoni mlahilha b'gass inert (eż. nitroġenu jew argonu) ⁽¹⁾ 3. Is-sistema tat-test għandha tippermetti l-kejl bħal ma huma pH, konċentrazzjoni ta' l-ossigenu u l-potenzal redox u tinkludi l-apparati tan-nassa għal prodotti volatili. Sistema tat-tip biometrika għandha tkun magħluqha sabiex tevita id-dhul ta' l-arja bid-diffużjoni.

1.9.1.6. *Kondizzjonijiet ta' l-inkubazzjoni fil-mistgħadar*

Sabiex tkun studjata t-trasformazzjoni tal-hamrija fl-għelieqi mistgħadra tar-ross, il-hamrija tkun mifquha fl-ilma b'saff ta' madwar 1-5 cm u s-sustanza tat-test tkun applikata mal-faġi ta' l-ilma (9). Hamrija b'fond ta' mill-anqas 5 cm hija rakkomandabbli. Is-sistema hija ventilata bl-arja permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, il-pH, il-konċentrazzjoni ta' l-ossigenu u l-potenzal tar-redox fis-saff akweju għandhom ikunu sorveljati u irraportati. Perijodu ta' pre-inkubazzjoni ta' mil anqas gimghatejn huwa meħtieġ qabel ma jibdew l-istudji tat-trasformazzjoni (ara s-sezzjoni 1.8.3.2).

1.9.1.7. *It-tul tat-test*

Ir-rata u l-passaġġ ta' l-istudji għandhom normalment ma jeċċedux 120 jum ⁽²⁾ 4(3) (6) (8), minhabba li wara dan, tnaqqis fl-attività mikrobjali tal-hamrija mal-mogħdija taż-żmien tkun mistennija f'sistema artifiċjali tal-laboratorju li tkun iżolata mit-tiġdid naturali. Meta meħtieġ għall-karatterizzazzjoni tat-tnaqqis fis-sustanza tat-test u fil-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri, l-istudji jistgħu ikompli għal perijodi itwal (eż. 6 jew 12 il-xahar) (8). Perijodi itwal ta' inkubazzjoni għandhom ikunu ġustifikati fir-rapport tat-test u akkumpanjati bil-kejl tal-biomassa matul u fit-tmiem ta' dawn il-perijodi.

1.9.2. *It-tweġġieq tat-test*

Madwar 50 sa 200 g hamrija (piż xott bażiku) ikun imqiegħed f'kull garafina ta' l-inkubazzjoni (ara l-Figuri 1 u 2 fl-Ażness 3) u l-hamrija ittrattata bis-sustanza tat-test b'wieħed mill-metodi deskritti fis-sezzjoni 1.8.2. Meta s-solventi organiċi huma wżati għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, dawn għandhom ikunu mneħħija mill-hamrija bl-evaporazzjoni. Il-hamrija tkun kompletament imħallta bi spatula u/jew biċ-ċekċik tal-garafina. Jekk l-istudju jkun imwettaq fil-kondizzjonijiet ta' għalqa mistgħadra, il-hamrija u l-ilma għandhom ikunu mħallta sewwa wara l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. Siltiet zġhar (eż. 1 g) tal-hamrija ittrattata għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test sabiex tkun verifikata distribuzzjoni uniformi. Għal metodu alternattiv, ara hawn taħt.

⁽¹⁾ Il-kundizzjonijiet ajrobiċi huma dominanti fil-hamrija tal-wiċċ kif ukoll fis-sub-surface tal-hamrija kif jidher fil-proġett ta' riċerka sponsorjat mill-UE. [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Il-kundizzjonijiet ajrobiċi jistgħu jseħhu biss okkażjonalment meta il-hamrija tinfaqa' bl-ilma wara xita qawwija jew meta jkun hemm kundizzjonijiet ta' ross li għadu fil-hliefa fl-għelieqi tar-ross.

⁽²⁾ L-istudji ajrobiċi jistgħu jintemmu hafna qabel 120 jum sakemm l-ultimate transformation pathway u l-ultimate mineralisation jintlaħqu tajjeb sa dak iż-żmien. It-terminazzjoni tat-test hija possibbli wara 120 jum, jew meta mill-inqas 90 % tas-sustanza għat-test jiġi trasformat, iżda biss jekk mill-inqas 5 % CO_2 jiġi fformat.

▼B

It-trattament għandu jkun jikorrispondi għall-ghola rata ta' l-applikazzjoni tal-prodott għall-protezzjoni ta' l-uċuh kif rakkommandat fl-istruzzjonijiet ta' l-użu u l-inkorporazzjoni uniformi sa fond xieraq fil-ghalqa (eż. is-saff ta' fuq, 10 cm ⁽¹⁾ 5 tal-hamrija). Per eżempju, għall-kimiċi tat-thaddir jew tal-hamrija applikati minghajr inkorporazzjoni, il-fond xieraq għall-kalkolazzjoni ta' kemm kimika għandha tkun miżjuda ma kull garafina huwa 2,5 cm. Għal hamrija inkorporata bil-kimiċi, il-fond xieraq huwa l-fond ta' l-inkorporazzjoni speċifikat fl-istruzzjonijiet ta' l-użu. Għal kimiċi ġenerali, ir-rata ta' l-applikazzjoni għandha tkun ikkalkolata fuq il-bażi tar-rotta l-aktar rilevanti tad-dhul; per eżempju, meta r-rotta ewlenija tal-dhul fil-hamrija hija mil-hama' tad-drenagg, il-kimika għandha tkun dożata fil-hama' f'koncentrazzjoni li tirrefletti l-koncentrazzjoni mistennija tal-hama' u l-ammont ta' hama' miżjud mal-hamrija għandu jirrefletti t-tgħabija normali tal-hama' mal-hamrija agrikola. Jekk din il-koncentrazzjoni ma tkunx għola biżżejjed sabiex tidentifika l-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni, inkubazzjoni separata tal-kampjunu tal-hamrija li jkun fiha rati għoljinm jista jkun ta' għajjnuna, imma rati eċċessivi li jinfluwenzaw il-funzjonijiet mikrobjali għandhom ikunu evitati (ara s-sezzjonijiet 1.5 u 1.8.2).

B'mod alternattiv, lott kbit (i.e. 1 sa 2 kg) ta' ġamrija jista jkun ittrattat bis-sustanza tat-test, imhalta bil-galbu f'magna xierqa tat-tahlit u imbagħad trasferita f'porzjonijiet żgħir ta' 50 sa 200 g fil-garafini ta' l-inkubazzjoni (per eżempju bl-użu tal-qsim tal-kampjun). Siltiet żgħir (eż. 1 g) tal-hamrija ittrattata għandhom ikunu analizzati għas-sustanza tat-test sabiex tkun verifikata distribuzzjoni uniformi. Tali proċedura hija preferibbli la darba tippermetti għal aktar distribuzzjoni uniformi tas-sustanza tat-test fil-hamrija.

Ukoll, kampjuni mhux trattati huma inkubati permezz ta' l-istess kondizzjonijiet (erobiċi) bħall-kampjuni trattati bis-sustanza tat-test. Dawn il-kampjuni huma wżati għall-kejl tal-biomassa matul u fit-tmiem ta' l-istudji.

Meta s-sustanza tat-test hija applikata mal-hamrija mdewwba fl-solvent(i) organiċi, kampjuni tal-hamrija ittrattati bl-istess ammont ta' solvent(i) huma inkubati bl-istess kondizzjonijiet (erobiċi) bħall-kampjuni ittrattati bis-sustanza tat-test. Dawn il-kampjuni huma wżati għall-kejl tal-biomassa, inizjalment, matul u fit-tmiem ta' l-istudji sabiex jivverifikaw l-effetti tas-solvent(i) fuq il-biomassa mikrobjali.

Il-garafini li jkun fihom hamrija ittratta huma jew imwahnha mas-sistema tan-nixxija kontinwa deskritta fil-Figura 1 jew magħluqa mal-kolobba ta' l-assorbozzjoni murija fil-Figura 2 (ara l-Anness 3).

⁽¹⁾ Il-kalkolu tal-koncentrazzjoni inizjali fuq *area basis* bl-użu ta' l-ekwazzjoni li ġejja:

$$C_{\text{soil}} [\text{mg/kg}_{\text{soil}}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{soil}}/\text{m}^3]}$$

C_{soil} = Il-koncentrazzjoni inizjali fil-hamrija [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

A = Ir-rata ta' applikazzjoni [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = il-hxuna tas-saff ta' hamrija ta' l-ghalqa [m]; d = *dry bulk density* tal-hamrija [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$].

Bħala regola, rata ta' applikazzjoni ta' 1 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ tirriżulta f'koncentrazzjoni ta' hamrija ta' bejn wiehded u iehor 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ f'saff ta' 10 cm (jekk tassumi *bulk density* ta' 1 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

▼B

1.9.3. **Kampjunar u kejl**

Garafini doppji ta' l-inkubazzjoni huma mnehhija fl-intervalli xierqa tal-hin u l-kampjuni tal-hamrija estratti bis-solventi xierqa ta' polarità differenti u analizzati ghas-sustanza tatA = Ir-rata ta' applikazzjoni [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = il-hxuna tas-saff ta' hamrija ta' l-ghalqa [m]; d = *dry bulk density* tal-hamrija [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$]. Bhala regola, rata ta' applikazzjoni ta' $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ tirrizulta f'koncentrazzjoni ta' hamrija ta' bejn wiehed u iehor $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ f'saff ta' 10 cm (jekk tassumi *bulk density* ta' $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$). test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni. Studju iddisinjat sewwa jinkludi garafini suffiċjenti hekk li żewġ garafini jkunu sagrifikati f'kull darba tal-kampjunar. Ukoll, it-tahlitiet ta' l-assorbazzjoni jew il-materjali solidi ta' l-assorbazzjoni ikunu mnehhija f'intervalli varji tal-hin (intervalli ta' sebat ijiet matul l-ewwel xhar u intervalli ta' 17 il-jum wara xhar) matul u fit-tmiem ta' l-inkubazzjoni ta' kull kampjun tal-hamrija, u analizzati għall-prodotti volatili. Apparti mil-kampjun tal-hamrija miġbur direttament wara l-applikazzjoni (jum 9 tal-kampjunar) mill-anqas 5 punti addizzjonali tal-kampjunar għandhom ikunu nkluzi. L-intervalli taż-żmien għandhom ikunu magħżula b'tali mod li l-għamla tat-tnaqqis tas-sustanza tat-test u l-għamla tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni jistgħu ikunu stabbiliti (eż. 0, 1, 3, 7 tijiem; 2, 3 ġimghat; 1, 3, 3 xhur, eċċ.).

Meta jsir użu mis-sustanza tat-test tikkettjata- ^{14}C , radjoattività mhux-estrattibbli tkun kwantifikata bil-kombustjoni u l-bilanċ tal-massa tkun ikkalkolata għal kull intervall tal-kampjunar.

Fil-każ ta' l-inkubazzjoni anerobika u mistgħadra, il-fażijiet tal-hamrija u ta' l-ilma huma analizzati flimkien ghas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni jew separatament bil-filtrazzjoni jew biċ-ċentrifugazzjoni qabel l-estrazzjoni u l-analizi.

1.9.4. **Testijiet Opzjonali**

L-istudju erobiċi, mhux-sterili, f'temperaturi addizzjonali u umidità tal-hamrija, jistgħu ikunu utili għall-kalkolu ta' l-influenza tat-temperatura u l-umidità tal-hamrija fuq ir-rati tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha fil-hamrija.

Aktar karatterizzazzjoni tar-radjoattività mhux-estrattibbli tista tkun ipprova bl-użu ta', per eżempju, estrazzjoni superficjali likwida.

2. **DATA**2.1. **TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI**

L-ammonti tas-sustanza tat-test, tal-prodotti tat-trasformazzjoni, is-sustanzi volatili (fi % biss) u huma mhux-estrattibbli għandhom ikunu murija bhala % tal-koncentrazzjoni inizjalment applikata u, meta xieraq, bhala $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ hamrija (ibbażata fuq il-piż tal-hamrija xorra) għal kull interval tal-kampjunar. Bilanċ tal-massa għandu jkun muri f'persentaġġ tal-koncentrazzjoni inizjalment applikata għal kull intervall tal-kampjunar. Preżentazzjoni grafika tal-koncentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test kontra ż-żmien tkun tippermetti kalkolu tan-nofs-hajja tat-trasformazzjoni tagħha jew DT_{50} . Prodotti ta' trasformazzjoni magħguri għandhom ikunu identifikati u l-koncentrazzjonijiet tagħhom għandhom ukoll ikunu pinġuti kontra ż-żmien sabiex juru r-rati tal-formazzjoni t-tnaqqis tagħhom. Prodott ta' trasformazzjoni magħguri huwa kwalunkwe prodott li jirrapprezenta = 10 % tad-doża applikataa fi kwalunkwe waqt matul l-istudju.

Il-prodotti volatili kin ingastati jagħtu xi indikazzjoni tal-potenzal volatili ta' sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha mill-hamrija.

▼B

Determinazzjonijiet aktar eżatti ta' nofs-hajja jew tal-valuri DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90} għandhom ikunu akkwistati bl-applikazzjoni xierqa tal-kalkoli bil-mudell kinetiku. Il-valuri ta' nofs-hajja u DT_{50} għandhom ikunu irrappurtati flimkien mad-deskrizzjoni tal-mudell użat, l-ordni tal-kinetiku u l-koeffiċjent tad-determinazzjoni (r^2). Kinetiċi ta' l-ewwel ordni huwa preferutu, sakemm $r^2 < 0,7$. Jekk xieraq, il-kalkoli għandhom ukoll ikunu applikati għall-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni. Eżempji ta' mudelli xierqa huma deskritti fir-referenzi 31 sa 35.

Fil-każ ta' studji ta' rati mwettqa f diversi temperaturi, ir-rati tat-trasformazzjoni għandhom ikunu deskritti bħala funzjoni tat-temperatura fi hdan il-medda tat-temperatura sperimentali bl-użu tar-relazzjoni Arrhenius, bil-formula:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

Meta $\ln A$ u B huma kostanti regrassivi mill-inteċessjoni u ż-żurzieqa, rispettivament, tal-linja ta' l-aħjar posizzjoni ġenerata minn regressjoni lineari $\ln k$ kontra $1/T$, k hija r-rata kostanti fit-temperatura t u T hija t-temperatura fi Kelvin. Attenzjoni għandha tingħata għall-medda limitata tat-temperatura li fiha ir-relazzjoni Arrhenius tkun valida fil-każ tat-trasformazzjoni li tkun irregolata bl-azzjoni mikrobjali.

2.2. EVALWAZZJONI U INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Għalkemm l-istudji huma mwettqa f'sistema artifiċjali tal-laboratorju, ir-riżultati jkunu jippermettu kalkolu tar-rata tat-traformazzjoni tas-sustanza tat-test u wkoll tar-rata tal-formazzjoni u tat-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni skond il-kondizzjonijiet fl-għalqa (36)(37).

Studju tal-passaġġ tat-trasformazzjonni tas-sustanza tat-test jipprovdi informazzjoni dwar il-mezz li bih is-sustanza aapplikata hija strutturament mibdula fil-hamrija bir-razzjoni kimika u mikrobjali.

3. RAPPORTAĠĠ

RAPPORT TAT-TEST

Ir-rapport tat-test għandu jinkludi:

Is-sustanza tat-test:

- l-isem komuni, l-isem kimiku, in-numru CAS, il-formula strutturali (bl-indikazzjoni tal-posizzjoni tat-tikketti meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat) u l-propjetajiet fiżiċi-kemikali rilevanti (ara sezzjoni 1.5);
- il-purità (l-impuritajiet) tas-sustanza tat-test;
- il-purità tar-radjokimika tal-kimika tikkettjata u l-attività speċifika (meta xieraq);

Sustanzi ta' referenza:

- l-isem kimiku u l-istruttura tas-sustanzi ta' referenza kif użati għall-karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodott tat-trasformazzjoni;

Hamrija tat-test:

- dettalji tas-sit tal-ġbir;
- id-data u l-proċedura tal-kampjunar tal-hamrija;

▼B

— il-proprietajiet tal-ħamrija, bħalma huma l-pH, il-kontenut karbonju organiku, it- *texture* (% ramel, % ħama, % tafal), *cation exchange capacity*, *bulk density*, il- karatteristika tar-ritenzjoni ta' l-ilma, u l-bijomass mikrobjali;

— it-tul tal-ħażna tal-ħamrija u l-kondizzjonijiet tal-ħażna (jekk maħżuna);

Kondizzjonijiet tat-test:

— id-dati tat-twettieq ta' l-istudji;

— l-ammont tas-sustanza tat-test applikata

— is-solventi użati u l-metodu ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test;

— il-piż tal-ħamrija inizjalment ittrattata u kampjunata matul kull interval għall-analizi;

— deskrizzjoni tas-sistema użata għall-inkubazzjoni;

— rati tan-nixxijiet ta' l-arja (għal sistemi biss ta' nixxija kontinwa);

— it-temperatura ta' l-apparat sperimentali;

— il-kontenut ta' l-umidità tal-ħamrija matul l-inkubazzjoni;

— il-biomassa mikrobjali inizjali, matul u fit-tmiem ta' l-istudji erobiċi;

— pH, il-konċentrazzjoni ta' l-ossigenu u l-potenzjal inizjali redox, matul u fit-tmiem ta' l-istudji erobiċi u tal-mistgħadar;

— metodu/i tal-estrazzjoni;

— metodi għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni, fil-ħamrija u l-materjali ta' l- assorbazzjoni;

— in-numru ta' replikati u n-numru ta' kontrolli.

Riżultati:

— riżultat tad-determinazzjoni ta' l-attività mikrobjali;

— ir-repettabilità u s-sensittività tal-metodi analitiċi wżati;

— ir-rati ta' l-irkupru (% valuri għal studju validu huma mogħtija fis-sezzjoni 1.7.1);

— ir-riżultati tat-tabelli espressi fi % tad-doża inizjali applikata u bħala mg.kg.₋₁ ħamrija (fuq il-bażi ta' piż xott);

— il-bilanċ tal-massa, matul u qrib it-tmiem ta' l-istudji;

— il-karatterizzazzjoni ta' radjoattività (marbuta) mhux strattibbli jew tar-residwi fil-ħamrija;

— kwantifikazzjoni tal-CO₂ rilaxxat u ta' komposti volatili oħrajn;

— grafika tal-konċentrazzjonijiet tal-ħamrija versus is-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni;

— in-nofs-ħajja jew DT₅₀, DT₇₅ u DT₉₀ tas-sustanza tat-test u, meta xieraq, dwar il-prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni li huma inkluzi fil-limiti ta' l-affidibilità;

▼B

- kalkolu tar-rata tad-degradazzjoni abjotika permezz ta' kondizzjonijiet sterili;
- kalkolu tal-kinetiċi tat-trasformazzjoni għas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti magħgħuri tat-trasformazzjoni;
- il-passaġġi propożiti tat-trasformazzjoni, meta xieraq;
- diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati;
- dettalji ġenerali (i.e. kromatogrammi tal-kampjun, kampjun tar-rati tal-kalkoli tat-trasformazzjoni u l-mezzi użati għall-identifikazzjoni tal-prodotti tat-traformazzjoni).

4. **REFERENZI**

- (1) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil -Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) Annex V to Dir. 67/548/EEC
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
- (19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds. *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215-221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass -Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105-120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59-63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197-200.
- (31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141-146.

▼B

- (32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.
- (33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz -Nachrichten Bayer 39, 188-204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47-60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.
- (37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.



ANNEX I

TENSJONI TA' L-ILMA, KAPAĊITÀ TA' L-GHALQA (FC) U L-KAPAĊITÀ TAŻ-ŻAMMA TA' L-ILMA (WHC) ⁽¹⁾

L-gholi tal-kolonna ta' l-ilma [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Rimarki
10 ⁷	7	10 ⁴	Hamrija xotta
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Il-punt tal-mitbiela
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	Il-medda tal kapaċità ta' l-ghalqa ^(d)
10 ²	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (approssimazzjoni)
1	0	0,001	Hamrija mistghadra bl-ilma

^(a) pF = log ta' cm kolonna ta' l-ilma.

^(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

^(c) Jikkorrispondi għal kontenut ta' ilma ta' bejn wiehed u ieħor 10 % framel, 35 % f' loam u 45 % f'tafal.

^(d) Il-kapaċità ta' l-ghalqa mhix kostanti iżda tvarja bit-tip ta' hamrija bejn pF 1,5 u 2,5.

It-tenzjoni ta' l-ilma hija mkejla fi cm tal-kolonna ta' l-ilma jew fi bar. Minhabba il-medda kbira tat-tenzjoni tal-gbid, din hija espressa semplicement bhala valur pF li huwa ekwivalenti għal-logaritmu ta' cm kolonna ta' l-ilma.

Il-kapaċità ta' l-ghalqa hija definita bhala l-ammont ta' ilma li jista jkun mahzun kontra l-gravità minn hamrija naturali, jumejn wara l-itwal perijodu ta' xita jew wara irrigazzjoni suffiċjenti hija determinata f'hamrija mhux imqallba, in situ fil-ghalqa. Il-kejl hu b'hekk mhux applikabbli għall-kampjuni tal-hamrija imqallba fil-laboratorju. Il-valuri FC li jkunu determinati f'hamrija mqallba jistgħu juru varjazzjonijiet sistematiċi kbar.

Il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma (Water holding capacity (WHC)) hija determinata fil-laboratorju b'hamrija mqallba u mhux imqallba bis-saturazzjoni ta' kolonna hamrija bl-ilma bit-trasport kapillari. Huwa partikolarment utili għal hamrija mqallba u jista jkun sa 30 % akbar mill-kapaċità ta' l-ghalqa (1) Huwa wkoll, b'mod sperimentali, aktar faċli li jkunu determinati b'mod affidabbli l-valuri FC.

Noti

⁽¹⁾ Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.



ANNEX 2

KONTENUTI TA' L-UMIDITÀ FIL-HAMRIJA (g ilma kull 100 g hamrija xotta) TAD-DIVERSI TIPI TA' HAMRIJA MINN PAJJIŻI VARJI

Umidità fil-hamrija Kontenut fi Tip tal-hamrija	skond il-pajjiż	Soil		
		WHC	pF = 1,8	pF = 2,5
Ramel	Ġermanja	28,7	8,8	3,9
Ramel Tafli	Ġermanja	50,4	17,9	12,1
Ramel Tafli	Żvizzera	44,0	35,3	9,2
Hama' taflija	Żvizzera	72,8	56,6	28,4
Tafal biċ-ċappa	Brażil	69,7	38,4	27,3
Tafal biċ-ċappa	Ġappun	74,4	57,8	31,4
Tafal imrammel	Ġappun	82,4	59,2	36,0
Hama' taflija	USA	47,2	33,2	18,8
Tafal imrammel	USA	40,4	25,2	13,3

▼ B

ANNEX 3

Figura 1

Eżempju ta' apparat *flow-through* għall-istudju tat-trasformazzjoni tal-kemikali fil-hamrija ⁽¹⁾ ⁽²⁾

1: valvola tal-labra	4: garafina tal-metaboliżmu tal-hamrija (mifquha bl-ilma biss għall-kondizzjonijiet anerobiċi u mistghadra)	6: nassa ta' l-aċidu sulfuriku għal komposti volatili alkalini
2: flixkun tal-ħasil tal-gass li jkun fih l-ilma	5: nassa ta' l-etilin glikol għal komposti volatili ta' l-ossigenu	7, 8: nassa ta' l-idrossidu tas-sosju għal CO ₂ & aċidi oħrajn volatili
3: ultra-membrana (kondizzjonijiet sterili biss), daqs tal-pori 0.2 µm		9: arloġġ tan-nixxija.

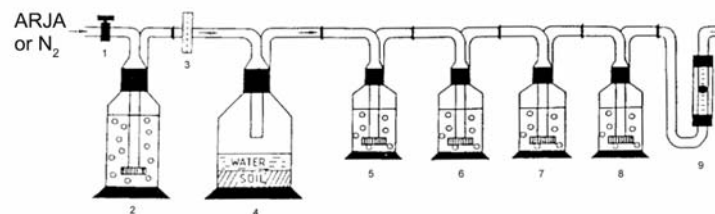
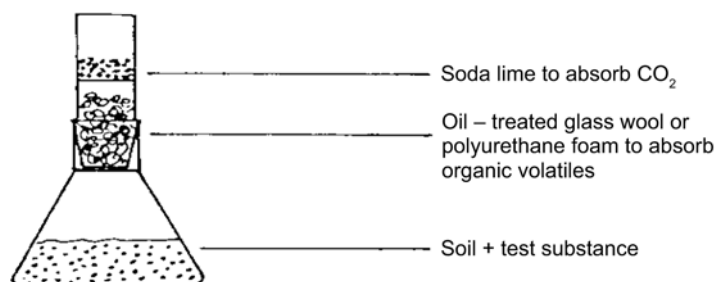


Figura 2

Eżempju ta' garaffina tat-tip *biometer* għall-istudju tat-trasformazzjoni tal-kemikali fil-hamrija ⁽³⁾



⁽¹⁾ Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

⁽²⁾ Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

⁽³⁾ Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B**C.24. TRASFORMAZZJONI EROBIKA U ANEROBIKA FIS-
SEDIMENT TAS-SISTEMI AKWATIČI****1. METODU**

Dan il-Metodu tat-Test huwa replika għal OECD TG 308 (2002)

1.1. INTRODUZZJONI

Il-kimiċi jistgħu jidhlu fl-ilmijiet tal-wiċċ, kemm baxxi u kemm fil-fond b'tali rotat bħala applikazzjoni diretta, skular tat-tbexxix, skular, soffija, drenagg, disposizzjoni ta' l-iskart, industria, effluwent domestiku jew agrikolu u d-deposizzjoni atmosferika. Dan il-Metodu ta' test jiddeskrivi l-metodu tal-laboratorju sabiex jassessja t-trasformazzjoni erobika u anerobika tal-kimiċi organiċi fis-sistema tas-sediment akwatiku. Dan il-Metodu tat-test huwa ibbażat fuq Linji ta' Gwida eżistenti (1) (2) (3) (4) (5) (6). Laqgħa ta' Hidma tal-OECD dwar l-Għażla tal-Hamrija/Sediment li nżammet f'Belgirate, l-Italja, fil-1955 (7) qabliet dwar in-numru u t-tip ta' hamrija għall-użu f'dan it-test. Il-Laqgħa ta' Hidma kienet ukoll għamlet rakkommandazzjonijiet li jirrigarjaw il-għir, it-tqandil u l-ħażna tal-kampjuni tal-hamrija, ibbażari fuq il-Linja ta' Gwida ISO (8). Tali studji huma meħtieġa għall-kimiċi li huma direttament applikati fil-hamrija jew li huma pjuttost li jilhqqu l-ambjent tal-hamrija.

Il-kondizzjonijiet fis-sistemi tas-sediment akwatiku naturali ta' spiss huma erobiċi fil-fażi ta' l-ilma tal-wiċċ. Is-saff tal-wiċċ tas-sediment jista' jkun jew erobiku jew anerobiku, waqt li sediment aktar fond, normalment ikun anerobiku. Sabiex ikunu inkluzi dawn il-possibbiltajiet kollha, iż-żewġ testijiet erobiċi u anerobiċi huma deskritti f'dan id-dokument. It-test erobiku jstimula kolonna erobika ta' l-ilma fuq saff ta' sediment erobiku li jkun fil-qiegħ b'xaqliba anerobika. It-test anerobiku jstimula sistema kompleta tas-sediment-ta'-l-ilma anerobiku. Jekk iċ-ċirkostanzi jindikaw li huwa meħtieġ li jkun hemm devjazzjoni sinifikanti minn dawn ir-rakkommandazzjonijiet, per eżempju bl-użu tal-qalba tas-sediment jew tas-sedimenti li jistgħu kienu ġew esposti għas-sustanza tat-test, metodi oħrajn huma disponibbli għal dan l-iskop (9).

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Standard International (SI) units (unitajiet tan-Norma Internazzjonali) għandhom ikunu wżati fi kwalunkwe każ.

Is-sustanza tat-test: Kwalunkwe sustanza, sew jekk kompost oriġinali jew il-prodotti rilevanti tat-trasformazzjoni.

Prodotti tat-trasformazzjoni: Is-sustanzi kollha li jirriżultaw mir-reazzjonijiet tat-trasformazzjoni biotiċi jew abiotiċi tas-sustanza tat-test, inkluzi iċ-CO₂ u l-prodotti li huma marbuta mar-residwi.

Residwi marbuta: "Residwi marbuta" tirrapreżenmta komposti fil-hamrija, pjanti jew animali, li jippersistu fil-matriċi fil-għamla ta' sustanza oriġinali jew tal-prodotti metaboliti/trasformazzjoni wara l-estrazzjoni. Il-metodu ta' l-estrazzjoni m'għandux sostanzjalment jibdel il-komposti nfushom jew l-istruttura tal-matriċi. In-natura tar-rabta tista' tkun kjarifikata parzjalment bil-metodi ta' l-estrazzjoni tat-tidil-tal-matriċi u b'tekniċi analitiċi sofistikati. Sal-lum, per eżempju, ir-rabtiet kovalenti joniċi u sorptivi, kif ukoll l-ingassar, kienu ġew identifikati b'dan il-mod. Generalment, il-formazzjoni tar-residwi marbuta tnaqqas il-bioaċċessibbiltà u l-biodisponabbiltà sinifikament (10) (Modifikati minn IUPAC 1984 (11)).

▼B

Trasformazzjoni erobika: (ossidazzjoni): Reazzjonijiet li jsehhu fil-preżenza ta' l-ossiġenu molekulari (12).

Trasformazzjoni anerobika: (tnaqqis): Reazzjonijiet li jsehhu fl-eskluzjoni ta' l-ossiġenu molekulari (12).

Ilmijiet naturali: Huma l-ilmijiet tal-wiċċ akkwistati min għadajjar, xmajjar, nixxijiet, eċċ.

Sediment: Hija tahlita ta' kostitwenti kimiċi minerali u organiċi, dawn ta' l-aħħar ikun fihom komposti ta' kontenut għoli tal-karbonju u n-nitroġenu u ta' piżijiet molekulari għoljin. Dan huwa depożitat b'ilma naturali u jiffirma interfazi ma dak l-ilma.

Mineralizzazzjoni: Hija d-degradazzjoni kompleta ta' kompost organiku lejn CO_2 , H_2O permezz tal-kondizzjonijiet erobiċi, u CH_4 , CO_2 u H_2O permezz tal-kondizzjonijiet anerobiċi. Fil-kuntest ta' dan il-metodu tat-test, meta kompost bit-tikketta-14C ikun użat, il-mineralizzazzjoni tfisser dehradazzjoni estensiva li matula atomu tal-karbonu tikkettjat ikun ossidizzat bil-rilaxx ta' l-ammont xieraq ta' $^{14}\text{CO}_2$ jew $^{14}\text{CH}_4$.

Half-life $t_{0.5}$: huwa l-hin mehtieg għal 50 % trasformazzjoni tas-sustanza tat-test meta t-trasformazzjoni tista tkun deskritta bil-kinetiċi ta' l-ewwel ordni; din hija indipendenti mill-konċentrazzjoni.

DT₅₀ (Ghibien Hin 50): Huwa l-hin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 50 %.

DT₇₅ (Ghibien Hin 75): Huwa l-hin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 75 %.

DT₉₀ (Ghibien Hin 90): Huwa l-hin li matulu l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test hija mnaqqsa bi 90 %.

1.3. SUSTANZI TA' REFERENZA

Is-sustanzi ta' referenza għandhom ikunu wżati għall-karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti bil-metodi spektroskopici u kromatografiċi.

1.4. INFORMAZZJONI DWARIS-SUSTANZATAT-TEST

Sustanza tat-test mhux-ittikkettjata jew ittikkettjata tista tkun użata sabiex tkejjel ir-rata tat-trasformazzjoni, għalkemm materjal tikkettjat huwa preferut. Il-materjal tikkettjat huwa mehtieg għall-istudju tal-passaġġ tat-trasformazzjoni u sabiex ikun stabbilit il-bilanċ tal-massa. Tikkettjar-14C huwa rakkomandat imma l-użu ta' iżotopi oħrajn bħal ma huma ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P , jistgħu wkoll ikunu utili. Sa kemm huwa possibbli, it-tikketta għandha tkun imqiegħda fil-parti(jiet) l-aktar stabbli tal-molekolu⁽¹⁾ 6. Il-Purità tal-kimika u/jew tar-radjo-kimika tas-sustanza tat-test għandha tkun mill-anqas 95 %.

Qabel jitwettag it-test, l-informazzjoni li ġejja, dwar is-sustanza tat-test, għandha tkun disponibbli:

- (a) solubilità fl-ilma (il-Metodu A.6);
- (b) solubilità f'solventi organiċi;
- (c) pressjoni tal-fwar (il-Metodu A.4) u l-liġi kostanti Henry;

⁽¹⁾ Per eżempju, jekk is-sustanza jkun fiha ċirku wiehed, l-ittikkettjar fuq dan iċ-ċirku huwa mehtieg. Jekk is-sustanza tat-test ikun fiha żewġ ċrieki jew iktar, studji separati jistgħu jkunu mehtieġa għall-evalwazzjoni tax-xorti ta' kull ċirku ittikkettjat u sabiex tinkiseb l-informazzjoni adattata fuq il-formazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni.

▼B

- (d) il-koeffiċjent tal-qsim n-oktano/ilma (il-Metodu A.8);
- (e) koeffiċjent ta' l-adsorbazzjoni (K_d , K_f jew K_{oc} , meta xieraq) (il-Metodu C.18);
- (f) idrolisi 9il-Metodu C.7);
- (g) kostant tad-dissoċjazzjoni (pK_a) (Linja ta' Gwida OECD 112) (13);
- (h) struttura kemikali tas-sustanza tat-test u l-posizzjoni tat-tikketta(i)-izotopika, jekk applikabbli.

Nota: It-temperatura li fiha dawn il-kejl kienu saru għandha tkun rappurtata.

Informazzjoni utili oħra tista tinkludi dettalji dwar it-tossicità tas-sustanza tat-test fuq il-mikroorganizmi, dettalji diġa disponibbli u/jew biodegradabbiltà inerenti, u dettalji dwar trasformazzjoni erobika u anerobika fil-hamrija.

Il-metodi analitiċi (inkluzi l-metodi ta' l-estrazzjoni u tat-tindif) għall-kwantifikazzjoni u l-identifikazzjoni tas-sustanza tat-test u tat-traformazzjoni tal-prodotti tagħha, għandhom ikunu disponibbli.

1.5. IL-PRINCĪPIJU TAL-METODU TAT-TEST

Il-metodu deskritt f'dan it-test jutilizza sistema tas-sediment akwatiku erobiku u anerobiku (ara l-Anness 1) li tippermetti:

- (i) il-kejl tar-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test f'sistema ta' sediment ta' l-ilma,
- (ii) il-kejl tar-rata tat-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test fis-sediment,
- (iii) il-kejl tar-rata tal-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test u/jew il-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha (meta tikkettjata-C14, is-sustanza tat-test hija użata),
- (iv) l-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni fil-fażijiet ta' l-ilma u tas-sediment, inkluz il-bilanċ tal-massa (meta sustanza tat-test, tikkettjata, tkun użata),
- (v) il-kejl tad-distribuzzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni tagħha bejn iż-żewġ fażijiet matul perijodu ta' l-inkubazzjoni fid-dlam (sabiex ikun evitat, per eżempju, it-tnebbit ta' l-alga) f'temperatur kostanti. Il-valuri nofs-hajja, DT_{50} , DT_{75} and DT_{90} huma determinati meta l-informazzjoni hekk tehtieg, imma m'għandhiex tkun estrapolata wisq lura lejn perijodu sperimentali (ara s-sezzjoni 1.2).

Mill-anqas żewġ sedimenti u l-imijiet assoċjati tagħhom huma mehtieġa għaž-żewġ studji erobiċi u anerobiċi rispettivament 97). B'dana kollu, jista jkun hemm każi meta aktar minn żewġ sedimenti għandhom ikunu wżati, per eżempju, dwar kimika li tista tkun prezenti f'ambjenti ta' l-ilma frisk u/jew marini.

▼B**1.6. L-APPLIKABBILTÀ TAT-TEST**

Il-metodu huwa applikabbli ghas-sustanzi kimiċi kollha (mhux ittikkettjati jew radjotikkettjati) li dwarhom metodu analitiku b'eżattezza u sensittività suffiċjenti huma disponibbli. Dan huwa applikabbli għal komposti kemm xejn volatili, mhux volatili, li jinħallu fl-ilma jew li ma jinħallux fl-ilma. It-test m'għandux ikun applikat lejn kimiċi li huma ferm volatili minn ġewwa l-hamrija (eż., fumiganti, solventi organiċi) u għalhekk ma jistgħux jinżammu fil-hamrija skond il-kondizzjonijiet sperimentali ta' dan it-test.

Dan il-metodu kien ġie applikat, s'issa, sabiex jistudja t-trasformazzjoni f'ilma frisk u sedimenti, imma l-prinċipju jista' wkoll ikun applikat għal sistemi estwarini/marini. Dan mhux adattat biex jistimu kondizzjonijiet f'ilma mexxej (eż. xmajjar) jew fil-baħar miftuh.

1.7. KRITERJA TAL-KWALITÀ**1.7.1. Irkupru**

L-estrazzjoni u l-analiżi ta', mill-anqas, nofs il-kampjunu duplikati ta' l-ima u tal-hamrija, wara ż-żieda tas-sustanza tat-test, tagħti l-ewwel indikazzjoni tar-repetabbiltà tal-metodu analitiku u ta' l-uniformità tal-proċedura ta' l-applikazzjoni ghas-sustanza tat-test. L-irkupri fi stadji aktar tard ta' l-esperimenti huma mogħtija bil-bilanċi rispettivi tal-massa (meta materjal tikkettjat ikunu wżat). L-irkupri għandhom ikunu fil-medda ta' minn 90 % sa 110 % tal-kimiċi ittikkettjati (6) u minn 70 % sa 110 % għal kimiċi mhux ittikkettjati.

1.7.2. Ir-repettabbiltà u s-sensittività tal-metodu analitiku

Ir-repettabbiltà tal-metodu analitiku (eskluzja l-peffċjenza ta' l-estrazzjoni inizjali) sabiex tkun kwantifikata s-sustanza tat-test u tat-trasformazzjoni tal-prodotti tista' tkun verifikata b'analizi dupplikata ta' l-istess estratt tal-hamrija, inkubat għal tul ta' żmien biż-żejjed għall-formazzjoni tat-trasformazzjoni tal-prodotti.

Il-limitu ta' sejbien (limit of detection (LOD)) tal-metodu analitiku ghas-sustanza tat-test u għat-trasformazzjoni tal-prodotti għandu jkun mill-anqas 0,01 mg.kg⁻¹ hamrija (bħala sustanza tat-test) jew 1 % tad-doża applikata, liema minnhom hija l-anqas. Il-limitu tal-kwantifikazzjoni (limit of quantification (LOQ)) għandu wkoll ikun speċifikat.

1.7.3. L-eżattezza tad-dettalji tat-trasformazzjoni

Analizi regressiva tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test bħala funzjoni tal-hin, tagħti informazzjoni xierqa dwar l-affidabbiltà tal-kurva tat-trasformazzjoni u tippermetti il-kolkolu tal-limiti affidabbli ta' nofs-hajjiet (fil-każ ta' psewdo kinetiċi ta' l-ewwel ordni) jew il-valuri DT₅₀ u, jekk xieraq, il-valuri DT₇₅ u DT₉₀

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU**1.8.1. Sistema u apparat tat-test**

L-istudju għandu jkun jkun imwettaq fl-kontenuturi tal-ħġieġ (eż. flixkien, tubi taċ-ċentrifuga), sakemm informazzjoni preliminari (bħal ma huwa l-koeffiċjent tal-qasmi n-oktanol-ilma, id-dettalji tas-sopzjoni, eċċ.) tkun tindika li s-sustanza tat-test tista' tkun tehel mal-ħġieġ, f'liema każ, materjal alternattiv (bħala ma hu t-teflon) għandu mnejn ikun ikkunsidrat. Meta s-sustanza tat-test hija magħrufa li tehel mal-ħġieġ, jista' jkun possibbli li titnaqqas din il-problema bl-użu ta' wiehed jew aktar minn dawn il-metodi li ġejjin:

▼B

- iddetermina l-massa tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni kif sorbiti mal-*h*-għieġ;
- assigura hasla bis-solvent ta' l-oġġetti kollha tal-*h*-għieġ fit-tmiem tat-test;
- l-użu ta' prodotti formulati (ara wkoll is-sezzjoni 1.9.2);
- uża ammont miżjud tal-ko-solvent bħala zieda tas-sustanza tat-test mas-sistema; jekk ko-solvent ikun użat, dan għandu jkun ko-solvent li ma jkunx idewweb is-sustanza tat-test.

Eżempji ta' apparat xieraq, i.e. sistemi tal-*h*-għieġ b'nixxija kontinwa u tat-tip biometriku, huma murija fl-Annessi 2 u 3, rispettivament (14). Sistemi utili oħrajn ta' l-inkubazzjoni huma deskritti fir-referenza 15. Id-disinn ta' l-apparat sperimentali għandu jippermetti l-iskambju ta' l-arja jew tan-nitroġenu u tal-prodotti volatili li jkunu ġew maqbuda. Il-qisien ta' l-apparat għandu jkun tali li l-*h*-għieġ tat-test ikun hemm konformità magħhom (ara s-sezzjoni 1.9.1). Il-ventilazzjoni tista tkun ipprovduta jew bi bżieġa ġentili jew bill-passaġġ ta' l-arja jew tan-nitroġenu minn fuq wiċċ l-ilma. F'dan il-każ ta' l-aħħar, taħwid ġentili ta' l-ilma minn fuq jista jkun rakkommandabbli għal distribuzzjoni aħjar ta' l-ossigenu jew tan-nitroġenu fl-ilma. Arja hielsa minn CO₂ m'għandhiex tkun użata minhabba li dan jirriżulta f'zidiet fil-pH ta' l-ilma. Fi kwalunkwe każ, it-tqallib tas-sediment mhux mixtieq u għandu jkun evitat, sa kemm ikun possibbli. Kimiċi kemm xejn volatili għandhom ikunu ittestjati f'sistema tip-ta'-barometru b'taħwid ġentili tal-wiċċ ta' l-ilma. Kontenituri magħluqa, bi spazju fil-wiċċ ta', jew l-arja atmosferika jew tan-nitroġenu, u fjali interni għal-qbil ta' prodotti volatili, jistgħu wkoll ikunu wżati (16). Skambju regolari tal-gass fl-isparju huwa meħtieġ fit-test erobiku sabiex jikkompensa għall-konsum ta' l-ossigenu mill-biomassa.

Nasses xierqa għall-ġbir tal-prodotti volatili tat-trasformazzjoni jinkludu, imma mhux ristretti għal, 1 mol.dm⁻³ tahlitiet ta' l-idrossidu tal-putassa jew ta' l-idrossidu tas-sodju, għad-diossidu tal-karbonju ⁽¹⁾ 7u tal-glikol etiliku, l-etanolamin jew 2 % paraffin fi xilene għal komposti organiċi. Volatili ffurmati permezz ta' kondizzjonijiet anero-biċi, bħal ma huwa l-metanju, jistgħu ikunu miġbura, per eżempju, b'għarbiel molekulari. Tali volatili jistgħu ikunu mahruqa, per eżempju, iċ-CO₂ li jgħaddi mill-gass matul tubu tal-kwart mimli bi CuO f'temperatura ta' 900 °C u li jiġbor iċ- CO₂ iffurmat f'assorbatur bl-alkali (17).

Strumentazzjoni tal-laboratorju għal analiżi kimika tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni hija meħtieġa (i.e. kromatografija likwida tal-gass (GLC), kromatografija likwida ta' mġieba qawwija (HPLC), kromatografija tas-saff' irqieq (TLC), spektroskopju tal-massa (MS), spektroskopju tal-kromatografija-tal-massa tal-gass (GC-MS), spettrometru tal-kromatografija tal-massa likwida (LC-MS), reżonanza manjetika nukleari (NMR), eyc.) inkluzi s-sistemi tas-sejbien għal kimiċi radjotikkettjati jew mhux tikkettjati, kif xieraq. Meta materjal radjo-tikkettjat ikun użat bħala għadd tax-xintillazzjoni tal-likwidu u ossidizzatur tal-kombustjoni (għall-kombustjoni ta' kampjuni tas-sediment qabel l-analiżi tar-radjo-attività) ikun ukoll meħtieġ.

Apparat normali iehor tal-laboratorju, għal determinazzjonijiet fiżiko-kimiċi u bioloġiċi (ara s-sezzjoni Tabella 1, is-sezzjoni 1.8.2.2(l-oġġetti tal-*h*-għieġ, il-kimiċi u r-reagenti huma meħtieġa, kif xieraq.

⁽¹⁾ Bħalma dawn is-soluzzjonijiet ta' abżorpzjoni alkalini jassorbu wkoll id-djossidju tal-karbonju mill-arja ta' ventilazzjoni u li iffurmati peremzz ta' respirazzjonni f'esperimenti ajrobiċi, għandhom jiġu mibdula f'intervali regolari sabiex tihi evitata is-saturazzjoni tagħhom u b'hekk it-telf tal-kapaċità ta' l-abżorpzjoni tagħhom

▼B**1.8.2. L-ghażla u n-numru ta' sedimenti akwatiċi**

Is-siti tal-kampjunar għandhom ikunu magħżula skond l-iskop tat-test, f'xi sitwazzjoni partikolari. Fl-ghażla tas-siti tal-kampjunar, l-istorja fl-isfond, agrikola, industrijali jew domestika dwar il-wesgħa tal-ġbir u ta' l-ilmijiet fin-naħa ta' fuq, għandhom ikunu ikkunsidrati. Is-sedimenti m'għandhomx ikunu wżati jekk ikunu ġew kontaminati bis-sustanza tat-test jew bl-istrutturi analogi tagħha matul l-4 snin preċedenti.

1.8.2.1. L-ghażla tas-sediment

Żewġ sedimenti huma normalment użati għall-istudju erobiċi (7). Iz-żewġ sedimenti magħżula għandhom ikunu differenti fir-rigward tal-kontenut tal-karbonju organiku u fil-formazzjoni tagħhom. Sediment wiehed għandu jkollu kontenut għoli ta' karbonju organiku (2,5-7,5 %) u ta' formazzjoni fina, is-sediment l-iehor għandu jkollu kontut baxx tal-karbonju organiku (0,5-2,5 %) u formazzjoni rozza. Id-differenza bejn il-kontenuti tal-karbonju organiku għandha, normalment, tkun ta' mill-anqas 2 %. “Formazzjoni fina” hija definita bħala (tafal + hama') [10] ⁽¹⁾ 8kontenut ta' > 50 % u “formazzjoni rozza” hija definita bħala (tafal + hama') kontenut ta' < 50 %. Id-differenza fil-kontenut (tafal + hama') għaż-żewġ sedimenti għandha normalment tkun mill-anqas 20 %. Fil-każi, meta l-kimika tista wkoll tilhaq l-ilmijiet marittimi, mill-anqas wahda mis-sistemi tas-sediment ta' l-ilma għandha tkun ta' oriġini marittima.

Għal studju strettament anerobiku, żewġ sedimenti (inklużi l-imijiet assoċjati tagħhom) għandhom ikunu miġbura minn żoni anerobiċi tal-partijiet ta' l-ilma tal-wiċċ (7). Iz-żewġ fażijiet tas-sediment u ta' l-ilma għandhom ikunu mqanda u ittrasportati bir-reqqa bl-eskluzjoni ta' l-ossigenu.

Parametri oħrajn jistgħu ikunu importanti fil-ghażla tas-sedimenti u għandhom ikunu ikkunsidrati fuq il-bażi ta' każ b'każ. Per eżempju, il-medda pH tas-sedimenti tkun importanti għall-kimiċi tat-testijiet li dwarhom trasformazzjoni u/jew sorpzjoni jistgħu ikunu pH-dipendenti. Id-dipendenza-pH tas-sorpzjoni tista tkun riflessa bil-pKa tas-sustanza tat-test.

1.8.2.2. Karatterizzazzjoni tal-kampjuni tas-sedimenti ta' l-ilma

Parametri ewlenija li għandhom ikunu mkejla u inklużi fir-rapport (b'referenza għall-metodu wżat) kemm għall-ilma u għas-sediment, u l-istadju tat-test li fih daww il-parametri għandhom ikunu determinati, huma miġbura f'sommarju fit-Tabella ta' hawn taht. Għall-informazzjoni, il-metodi tas-sejbin għad-determinazzjoni ta' dawn il-parametri huma mogħtija fir-referenzi (18) (19) (20) (21).

B'zieda, parametri oħrajn jistgħu li jkunu metieġa li jkunu mkejla u nklużi fir-rapport fuq il-bażi ta' każ b'każ (eż. għall-ila frisk: Particelli, alkalinità, toqol. Kondittività, NO₃/PO₄ (relattività u valuri individwali); għas-sedimenti: Il-kapaċità ta' l-iskambju tal-jonji, il-kapaċità taż-żamma ta' l-ilma, Il-karbonat, in-nitroġenu u l-fosfru totali; u għas-sistemi marittimi: Salinità). L-analiżi tas-sedimenti u l-ilma għan-nitrat, is-sulfat u l-hadid bio-disponibbli, u l-ossibbiltà ta' aċetat-taturu elettronni oħrajn tista tkun utili fl-assaġġ tal-kondizzjonijiet redox, speċjalment b'relazzjoni mat-trasformazzjoni anerobika.

⁽¹⁾ Tafal u hama) hija il-frazzjoni minerali tas-sediment bid-daqs tal-particella ta' < 50 µm.


Parametri tal-kejl għall-karatterizzazzjoni tal-kampjunu fis-sediment ta' l-ilma (7)(22)(23)

Parametru	Stadju tal-proċedura tat-test					
	Kampjun ta' l-ghalqa	Wara t-tqandil	Bidu ta' l-akklamit - azzjoni	Bidu tat-test	Matul it-test	Tmiem tat-test

Ilma

Origini/sorsi	x					
temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
O ₂ konċentrazzjoni (*)	x		x	x	x	x
Potenzal Redox (*)			x	x	x	x

Sediment

Origini/sorsi	x					
Il-fond tas-saff	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuzzjon i tad-daqs tal-particelli		x				
TOC		x	x	x		x
Biomassa mikrobjali (*)		x		x		x
Potenzal Redox (**)	Osservazzjonijiet (lewn/rih a)		x	x	x	x

(*) Riżultati tar-riċerka riċenti wrew li il-kejl tal-konċentrazzjonijiet tal- *water oxygen* l-oġġgħu ta' l-ilma u tal-potenzjalitajiet *redox* m'għandhomx valur la mekkanistiku u lanqas ta' tbassir fejn għandu x'jaqsam it-tkabbir u l-iżvilupp tal-popolazzjoni mikrobjali fl-ilmijiet tal-wiċċ. (24) (25).

(**) Id-determinazzjoni tad-domanda bijokemikali ta' l-oġġgħu (BOD, fit-tehid tal-kampjuni ta' l-ghelieqi, fil-bidu u fi tmiem it-test) jistgħu jkunu għodod ahjar għall-interpretazzjoni u l-evalwazzjoni tal-bijotrasformazzjoni ajrobika tar-rati u r-rotot ajrobiċi (26), il-metodu ta' fumigazzjoni (27) jew *plate count measurements* (eż. il-batterja, l-*actinomyces*, *fungi* u l-kolonji totali) għal studji ajrobiċi; ir-rata tal-*methanogenesis* għal studji anajrobiċi.

1.8.3. Ġbir, Tqandil u Hażna
1.8.3.1. Il-ġbir

L-abbozz tal-gwida ISO dwar il-kampjunar tas-sediment tal-qiegh 98 għandu jkun użat għall-kampjunar tas-sediment. Kampjuni tas-sediment għandhom ikunu miġbura mis-saff intier ta' fuq, 5 sa 10 cm, tas-sediment. L-ilma assoċjat għandu jkun miġbur mill-istess sit jew lokalità u fl-istess waqt bħas-sediment. Għal studju anerobiku, il-ġbir tal-kampjuni tas-sediment u ta' l-ilma assoċjat u t-trasportazzjoni tagħhom għandu jkun bl-eskluzjomni ta' l-oġġgħu (28) (ara s-sezzjoni 1.8.2.1). Uħud mill-apparati tal-kampjunar huma deskritti fil-litteratura (8) (23).

▼B**1.8.3.2. Tqandil**

Is-sediment huwa separat mill-ilma permezz tal-filtrazzjoni u s-sediment ikun magħrbel fl-undit minn għarbiel ta' 2 mm bl-użu ta' l-ilma eċċessiv tal-lokalita, li imbagħad ikunu mormi. Imbagħad, ammonti magħrufa ta' sedimenti u ilma huma mhallta fir-relattività mixtieqa (ara s-sezzjoni 1.9.1) f'garafini ta' l-inkubazzjoni u ippreparati għall-perijodu ta' l-akklamizzazzjoni (ara s-sezzjoni 1.8.4). Għal studju anerobiku, il-passi kollha tat-tqandil għandhom isehhu bl-eskluzjoni ta' l-ossigenu (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. Hażna

L-użu ta' kampjun frisk tas-sediment u l-ilma huwa ferm rakkommandabbli, imma jekk hażna tkun mehtieqa, Is-sediment u l-ilma għandhom ikunu magħrbla kif deskritt hawn fuq u maħżuna flimkien, mifqugha bl-ilma (6-10 cm saff ta' ilma), fid-dlam, fi 4 ± 2 °C għal massimu ta' [13] ġimghat (7)(8)(23). Il-kampjuni li huma ntizi għal studji erobiċi għandhom ikunu maħżuna b'aċċess liberu ta' arja 9eż. f'kontenituri miftha), waqt li daww għal studji erobiċi bl-eskluzjoni ta' l-ossigenu. L-iffriżar tas-sediment u l-ilma u waqt l-inxif tas-sediment m'għandux isehh matul it-trasportazzjoni u l-hażna.

1.8.4. Preparazzjoni tal-kampjuni sediment/ilma għat-test

Perijodu ta' akklamitazzjoni għandu jsehh qabel iz-zieda tas-sustanza tat-test, b'kull kampjun ta' sediment/ilma jkun miqiegħed fir-riċipjent ta' l-inkubazzjoni li għandu jkun użat għat-test ewlieni, u l-akklamizzazzjoni tkun imwettqa skond l-istess kondizzjonijiet bħal fit-test ta' l-inkubazzjoni (ara s-sezzjoni 1.9.1). Il-perijodu ta' l-akklimizzazzjoni huwa z-zmien mehtieq għal stabbiltà raġjonevoli tas-sistema kif rifless bil-pH, il-koncentrazzjoni ta' l-ossigenu fl-ilma, il-potenzal tar-redox tas-sediment u l-ilma, u l-fażijiet tas-separazzjoni makroskopika. Il-perijodu ta' l-akklamizzazzjoni għandu normalment idem bejn ġimgha wahda u ġimghatejn u m'għandux jeċċedi erba' ġimghat. Ir-rizultati tad-determinazzjonijiet imwettqa matul dan il-perijodu għandhom ikunu nkluzi fir-rapport.

1.9. L-IMGIEBA TAT-TEST**1.9.1. Kondizzjonijiet tat-test**

It-test għandu jkun imwettaq fl-apparat ta' l-inkubazzjoni (ara s-sezzjoni 1.8.1) b'relattività tal-volum ta' l-ilma mas-sediment ta' bejn 3:1 u 4:1, u saff tas-sediment ta' 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm) ⁽¹⁾ 9. Ammont minimu ta' 50 g ta' sediment (bażi ta' piż xott) kull riċipjent ta' l-inkubazzjoni huwa rakkommandat.

It-test għandu jkun imwettaq fid-dlam, b'temperatura kostanti fil-medda ta' 1- sa 30 °C. Temperatura ta' (20 ± 2) °C hija xierqa. Meta xieraq, temperatura addizzjonali aktar baxxa (eż. 10 °C) tista tkun meqjusha fuq il-baži ta' każ b'każ, jiddependi mill-informazzjoni mehtieqa mit-test. It-temperatura ta' l-inkubazzjoni għandha tkun sorveljata u nkluża fir-rapport.

⁽¹⁾ Studji riċenti wrew li il-hzin f'temperatura ta' 4 °C jista' jwassal għal tnaqqis tal-kontenut tal-karbonju organiku tas-sediment li jista' jirrizulta fi tnaqqis ta' l-attività mikrobjali (34).

▼B

1.9.2. **It-trattament u l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test**

Konċentrazzjoni wahda tal-kimika tat-test hija użata ⁽¹⁾. Għall-kimiċi tal-protezzjoni ta' l-uċuġ applikati direttament lejn is-saffi ta' l-ilma, id-doża massima tat-tikketta għandha tkun meqjusa bħala, ir-rata massima ta' l-applikazzjoni ikkalkolata fuq il-bażi taż-żona tal-wiċċ ta' l-ilma fir-reċipjent tat-test. Fil-każi l-oħrajn kollha, il-konċentrazzjoni li trid tkun użata għandha tkun ibbażata fuq previżjonijiet mill-emissjonijiet ambjentali. Attenzjoni għandha tinghata sabiex tkun assicurata li konċentrazzjoni adegwata tas-sustanza tat-test tkun applikata sabiex tikkaratterizza r-rotta tat-trasformazzjoni u tal-formazzjoni u t-tnaqqis tal-prodotti tat-trasformazzjoni. Jista' jkun mehtieg li jkun applikati dozi aktar għoljin (eż. 19-il darba) f'sitwazzjonijiet meta l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test ikunu qrib il-limitu tas-sejbien fil-bidu ta' l-istudju u/jew meta prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri ma jkunux faċli li jkun misjuba meta preżenti fi 10 % tar-rata ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. B'dana kollu, jekk konċentrazzjonijiet għola tat-test huma wżati, dawn m'għandhom ikollhom effett hażin sinifikanti fuq l-attività mikrobjali tas-sistema ilma-sediment. Sabiex tkun akkwistat konċentrazzjoni kostanti tas-sustanza tat-test fir-reċipjenti ta' qisien differenti, aġġustament tal-kwantità tal-materjal applikat jista' jkun meqjus bħala xieraq, ibbażat fuq il-fond tal-kolonna ta' l-ilma fir-reċipjent b'relazzjoni mal-fond ta' l-ilma fl-għalqa (li huwa preżunt li huwa 100 cm, imma fond ieġor jista' jkun użat). Ara l-Anness 4 għal eżempju tal-kalkolazzjoni.

Idealment, is-sustanza tat-test għandha tkun applikata bħala tahlita akweja ġewwa l-faġi ta' l-ilma tas-sistema tat-test. Jekk ma jkunx jista' jsir mod ieħor, l-użu ta' ammonti anqas ta' solventi li jithaltu ma l-ilma (bħal ma huma l-aċetun, l-etanol) huwa permisibbli għall-applikazzjoni u d-distribuzzjoni tas-sustanza tat-test, imma dan m'għandux jeċċedi 1 % v/v u m'għandux ikollu effetti ħżiena fuq l-attività mikrobjali tas-sistema tat-test. Attenzjoni għandha tinghata fil-ġenerazzjoni tat-tahlita akweja tas-sustanza tat-test – l-użu ta' kolonni ġenerati u t-tahlit minn qabel jista' jkun xieraq sabiex tkun assicurata omogenità kompluta. B'segwiment taż-żieda tat-tahlita akweja mas-sistema tat-test, taħvid ġentili tal-faġi ta' l-ilma huwa rakkommandat, li jjanqal is-sediment mill-anqas possibbli.

L-użu ta' prodotti formulati mhux normalment rakkommandat minhabba li l-ingredjenti tal-formulazzjoni jistgħu jaffettwaw is-sustanza tat-test u/jew tal-prodotti tat-trasformazzjoni bejn il-fażijiet ta' l-ilma u tas-sediment. B'dana kollu, eż. għal sustanzi tat-test li ma tantx jinħallu, l-użu ta' materjal formulat jista' jkun alternattiva xierqa.

In-numru ta' reċipjenti ta' l-inkubazzjoni jiddependi min-numru ta' drabi tal-kampjunar (ara s-sezzjoni 1.9.3). Numru suffiċjenti tas-sistemi tat-test għandhom ikunu nkluzi sabiex żewġ sistemi jistgħu ikunu sagrifikati f'kull waqt tal-kampjunar. Meta l-unitajiet tal-kontroll ta' kull sistema tas-sediment akwatiku jkun wżati, dawn m'għandhomx ikunu ittrattati bis-sustanza tat-test. L-unitajiet tal-kontroll jistgħu ikunu wżati għad-determinazzjoni tal-biomassa mikrobjali tas-sediment u tal-karbonju organiku totali ta' l-ilma u tas-sediment fit-tmiem ta' l-istudju. Iz-żewġ unitajiet tal-kontroll (i.e. unità tal-kontroll wahda ta' kull sediment akwatiku) jistgħu ikunu wżati sabiex jissorveljaw il-parametri mehtieġa fis-sediment u fl-ilma matul il-perjodu ta' l-akklamitizzazzjoni (ara t-Tabella fis-sezzjoni 1.8.2.2). Żewġ unitajiet addizzjonali tal-kontroll għandhom ikunu nkluzi fil-każ li sustanza tat-test tkun applikata permezz ta' solvent li jkejjel l-effetti ħżiena fuq l-attività mikrobjali tas-sistema tat-test.

⁽¹⁾ Test bit-tieni konċentrazzjoni jista' jkun utili għall-kemikali li jilhq u l-ilmijiet tal-wiċċ permezz ta' *entryroutes* differenti u dan jwassal għal konċentrazzjonijiet differenti b'mod sinifikattiv, sakemm l-iktar konċentrazzjoni baxxa tista' tkun analizzata b'kemm jista' jkun eżattezza.

▼B**1.9.3. It-tul taż-żmien u l-kampjunar tat-test**

It-tul ta' l-esperiment m'għandux normalment jeċċedi 100 jum (6), u għandu jkompli sa kemm il-passaġġ tal-gradazzjoni u l-ghamla tad-distribuzzjoni ta' l-ilma/sediment tkun stabbilita jew meta 90 % tas-sustanza tat-test tkun dissipata fit-trasformazzjoni u/jew il-volatilizazzjoni. In-numru ta' waqtiet tal-kampjunar għandhom ikunu mill-anqas sitta (inkluż il-hin żero), bi studju preliminarji voluntarju (ara s-sezzjoni 1.9.4) ikunu wżat sabiex tkun stabbilit r-regola xierqa tal-kampjunar u tat-tul tat-test, sakemm informazzjoni suffiċjenti ma tkunx diġa disponibbli dwar is-sustanza tat-test minn studju preċedenti. Għal sustanzi tat-test idrofobiċim punti addizzjonali tal-kampjunar matul il-perijodu inizjali ta' l-istudju jistgħu ikunu mehtieġa sabiex tkun determinata r-rata tad-distribuzzjoni bejn il-fażijiet ta' l-ilma u tas-sediment.

Filwaqtiet xierqa tal-kampjunar, ir-reċipjenti kollha ta' l-inkubazzjoni (dupplikati) huma mnehhija għall-analiżi. Is-sediment u l-ilma tal-wiċċ huma analizzati separatament⁽¹⁾ 1. L-ilma tal-wiċċ għandu jkun imnehhji bil-galbu b'ċaqlieq mill-anqas tas-sediment. L-estrazzjoni u l-karatterizzazzjoni tas-sustanza tat-test u tal-prodotti tat-trasformazzjoni għandhom isegwu l-proċeduri analitiċi xierqa. Attenzjoni għandha tingħata għat-tnehhija tal-materjal li jkun jkun ġie assorbit mar-reċipjent ta' l-inkubazzjoni jew mat-tibi ta' l-interkonnessjoni wżati li jaqdbu l-volatili.

1.9.4. Test preliminarju voluntarju

Jekk ir-regolazzjoni tat-tul u tal-kampjunar ma jistgħux ikunu ikkal-kolati minn studju relevanti oħrajn dwar is-sustanza tat-test, studju preliminarji voluntarju jista jkun meqjus bħala xieraq, li għandu jkun imwettaq bl-użu ta' l-istess kondizzjonijiet tat-test propożiti għall-istudju definittiv. Kondizzjonijiet sperimentali relevanti u r-riżultati mit-test preliminarju, jekk imwettaq, għandhom ikunu rrapportati fil-qosor.

1.9.5. Kejl u analiżi

Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u l-prodotti tat-trasformazzjoni f'kull waqt tal-kampjunar fl-ilma u fis-sediment għandhom ikunu mkejla u rrapportati (bħala konċentrazzjoni u bħala persentaġġ ta' l-applikati). Generalment, il-prodotti tat-trasformazzjoni misjuba fl- ≥ 10 % tar-radoattività applikata fis-sistema totali ta' ilma-sediment fi kwalunkwe waqt tal-kampjunar għandhom ikunu identifikati, sakemm ma jkunx raġjonevolment ġustifikat mod ieħor. Il-prodotti tat-trasformazzjoni li dwarhom il-konċentrazzjonijiet huma kontinwament miżjuda matul l-istudju għandhom ukoll ikunu ikkonsidrati għall-identifikazzjoni, anki jekk il-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jkunux jeċċedu l-limitu mogħti hawn fuq, minhabba li dan jista jindika persistenza. Dan ta' l-aħħar għandu jkun ikkonsidrat fuq il-bażi ta' każ b'każ, bil-ġustifikazzjoni tkun ipprovduta fir-rapport.

Ir-riżultati mis-sistemi tal-qbid tal-gassijiet/volatili (CO₂ u oħrajn, i.e. komposti organiċi volatili) għandhom ikunu rrapportati f'kull waqt tal-kampjunat. Ir-rati tal-mineralizzazzjoni għandhom ikunu rrapportati. Residwi mhux estrattibbli (marbuta) fis-sediment għandhom ikunu irrapportati f'kull punt tal-kampjunar.

⁽¹⁾ F'każijiet fejn ir-re-oxidation mghaġġla tal-prodotti tat-trasformazzjoni anajrobika tista' ssehh, il-kondizzjonijiet anajrobiċi għandhom jinżammu waqt l-ikkampjunar u l-analiżi.

▼B**2. DATA****2.1. TRATTAMENT TAR-RIŻULTATI**

Il-bilanċ jew l-irkupru tal-massa totali (ara s-sezzjoni 1.7.1) tar-radjoattività miżjuda għandhom ikunu ikkalkolati f'kull waqt tal-kampjunar. Ir-riżultati għandhom ikunu irrapurtati bħala persentaġġ tar-radjoattività miżjuda. Id-distribuzzjoni tar-radjoattività bejn l-ilma u s-sediment għanda tkun irrapurtata bħala konċentrazzjonijiet u persentaġġi, f'kull waqt tal-kampjunar.

In-nofs-hajja, il-DT₅₀ u, jekk xieraq, il-DT₇₅ u il-DT₉₀ tas-sustanza tat-test għandhom ikunu ikkalkolati flimkien mal-limiti ta' affidabbilità tagħhom (ara s-sezzjoni 1.7.3). L-informazzjoni dwar ir-rata tad-dissipazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ilma u fis-sediment tista tkun akkwistata mill-użu ta' l-ghodda xierqa ta' l-evalwazzjoni. Dawn jistgħu ivarjaw mill-applikazzjoni tal-kinetici ta' pseudo-l-ewwel ordni, tat-teknika li timxi mal-kurva empirika li tapplika għal soluzzjonijiet grafici jew numerici u l-assaġġ aktar kumpless bl-użu, per eżempju, tal-mudelli ta' kompartment singolu jew multiplu. N Aktar dettalji jistgħu ikunu akkwistati mill-letteratura rilevanti kif ippubblikata (35) (36) (37).

Ir-resqien kollu għandu s-sahha u d-debbolizzi tiegħu u jvarja konsiderevolment fil-komplessità, Preżunzjoni tal-kinetici ta' l-ewwel ordni tista ssir b'simplifikazzjoni żejda tal-proċessi tad-degradazzjoni u tad-distribuzzjoni, imma meta possibbli li tagħti terminu (ir-rata kostanti jew nofs-hajja) li faċilment ikunu jifthiemu u l-valur fil-mudellar tas-simulazzjoni u l-kalkolu tal-konċentrazzjonijiet ambjentali previsti. Resqien empiriku jew trasformazzjonijiet lineari jistgħu jirriżultaw fi dħul aħjar tal-kurvi mad-dettall u għalhekk jippermettu estimi aħjar tan-nofs-hajja, DT₅₀ u, jekk xieraq, il-valuri DT₇₅ u DT₉₀. L-użu tal-kostanti derivati, b'dana kollu huwa limitat. Mudelli kumpartimentali jistgħu jiġġeneraw numru ta' kostanti utili ta' valur fir-riskju ta' l-assaġġ li jiddeskrivi r-rata tad-degradazzjoni f'kumpartimenti differenti u d-distribuzzjoni tal-kimika. Dawn għandhom ukoll ikunu wżati għall-estimi tal-kostanti tar-rata għall-formazzjoni u d-degradazzjoni ta' prodotti maġġuri tat-trasformazzjoni. Fil-każi kollha, il-metodu wżat għandu jkun ġustifikat u min jagħmel l-esperiment għandu juri b'mod grafiku u/jew l-istatistika ta' dħul aħjar.

3. RAPPORTAĠĠ**3.1. RAPPORT TAT-TEST**

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

Is-sustanza tat-test:

— l-isem komuni, l-isem kimiku, in-numru CAS, il-formula strutturali (bl-indikazzjoni tal-posizzjoni tat-tikketti meta materjal radjotikkettjat ikun użat) u l-propjetajiet fiżiċi-kemikali rilevanti;

— il-purità (l-impurità) tas-sustanza tat-test;

— il-purità tar-radjokimika tal-kimika tikkettjata u l-attività speċifika (meta xieraq);

▼B

Sustanzi ta' referenza:

- l-isem kimiku u l-istruttura tas-sustanzi ta' referenza kif użati għall-karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodott tat-trasformazzjoni;

Sedimenti u ilmijiet tat-test:

- il-lokalità u d-deskrizzjoni tas-sit(i) tal-kampjunar tas-sediment akwatu, inkluża, jekk possibbli, l-istorja tal-kontaminazzjoni;
- l-informazzjoni kollha li tirrigwardja il-ġbir, il-ħażna (jekk ikun hemm) u l-akklamazzjoni tas-sistemi ta' l-ilma/sediment;
- karatteristiċi tal-kampjunar ilma-sediment kif elenkati fit-Tabella fis-sezzjoni 1.8.2.2.

Kondizzjonijiet tat-test:

- is-sistema tat-test użata (eż. in-nixxija kontinwa, il-biometrika, il-mezz tal-ventilazzjoni, il-metodu tat-tahwid, il-volum ta' l-ilma, il-massa tas-sediment, il-ħxuna kemm tas-saff ta' l-ilma u tas-sediment, il-qisem tar-reċipjenti tat-test, eċċ.);
- l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test għas-sistema tat-test: Il-konċentrazzjoni tat-test kif użata, in-numri ta' repliki u l-modula tal-kontrolli ta' l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test (eż. l-użu tas-solvent jekk ikun hemm), eċċ.;
- temperatura ta' l-inkubazzjoni;
- id-drabi tal-kampjuna;
- il-metodi ta' l-estrazzjoni u l-effiċjenzi kif ukoll il-metodi analitiċi u l-limiti tas-sejbien;
- il-metodi għall-karatterizzazzjoni/identifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni;
- devjazzjonijiet mill-protokoll tat-test jew mill-kondizzjonijiet tat-test, matul l-istudju.

Riżultati:

- dettalji fi stat originali tal-figuri li jirrapreżentaw analiżi (id-dettalji kollha fi stat originali għandhom ikunu mahżuna fl-arkivji-GLP);
- ir-repettabilità u s-sensittività tal-metodi analitiċi użati;
- ir-rati ta' l-irkupru (% valuri għal studju validu huma mogħtija fis-sezzjoni 1.7.1);
- tabelli tar-riżultati espressi bħala % tad-doza applikata u fi mg.kg-1 fl-ilma, sediment u s-sistema totali (% biss) għas-sustanza tat-test u, jekk xieraq, għall-prodotti tat-trasformazzjoni u tar-radjoattività mhux-estrattibbli;
- il-bilanċ tal-massa, matul u qrib it-tmiem ta' l-istudji;
- rapreżentazzjoni grafika tat-trasformazzjoni fl-ilma u l-frazzjonijiet tas-sediment u fis-sistema totali (inkluża l-mineralizzazzjoni);
- rati tal-mineralizzazzjoni;

▼B

- in-nofs-ħajja, il- DT_{50} u, jekk xieraq, il-valuri DT_{75} u DT_{90} tas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-proddotti tat-trasformazzjoni magġuri inkluzi fil-limiti ta' l-affidabbiltà fl-ilma, fis-sediment u fis-sistema totali;
- kalkolu tal-kinetiċi tat-trasformazzjoni għas-sustanza tat-test u, meta xieraq, il-prodotti magġuri tat-trasformazzjoni;
- il-passaġġi propożiti tat-trasformazzjoni, meta xieraq;
- diskussjoni tar-riżultati.

4. REFERENZI

- (1) Linja ta' Gwida BBA għall-eżaminazzjoni tal-protetturi tal-pjanti fil-progress tar-reġistrazzjoni. (1990). Parti IV, Sezzjoni 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Il-Ġermanja.
- (2) Kummissjoni għar-reġistrazzjoni tal-pestiċidi: L-Applikazzjoni għar-reġistrazzjoni tal-pestiċidi. (1991). Part G, Imġieba tal-prodott u l-metabizmi tiegħu fil-ħamrija, fl-ilma u fl-arja, Sezzjoni G.2.1 (a). L-Olanda.
- (3) MAFF Direttorat dwar is-Sigurtà tal-Pestiċidi. (1992). Linja ta' Gwida preliminari għall-imġieba tat-testijiet dwar il-biodegradabbiltà tal-pestiċidi f'sistemi naturali ta' sediment/ilma. Ref No SC 9046. Renju Unit.
- (4) Agrikoltura Kanada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.
- (5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry* (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 631-637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661-667.
- (18) Black, C.A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D.L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*. Longman.
- (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chemistry* 44, 1038- 1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop "A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3-4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858-2868.
- (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* 329-338.
- (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197-203.
- (27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigationextraction method.
- (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13-21.
- (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850-857.
- (30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550.
- (31) Pagga, U. and Beimbom, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499-1509.

▼B

- (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597-3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961-968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, 187-203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, 47-60.
- (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. *Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases*, pp 1349-1354.



ANNEX I

LINJA TA' GWIDA DWAR IS-SISTEMI TAS-TEST EROBIKU U ANEROBIKU

Sistema ta' test erobiku

Is-sistema tat-test erobiku deskritta f'dan il-metodu tat-test tikkonsisti minn saff ilma erobiku (konċentrazzjoni tipika ta' l-ossigenu fil-medda bejn 7 u 10 mg·l⁻¹) u saff tas-sediment, erobiku fil-wiċċ u anerobiku taht il-wiċċ (medja tipika tal-potenzali redox (Eh) fiż-żona anerobika tas-sediment fil-medda minn -80 sa -190 mV). L-arja umida tkun mogħddiha matul il-wiċċ ta' l-ilma ta' kull unità ta' l-inkubazzjoni sabiex iżżomm ossigenu suffiċjenti fl-ispazju ta' fuq.

Sistema ta' test anerobiku

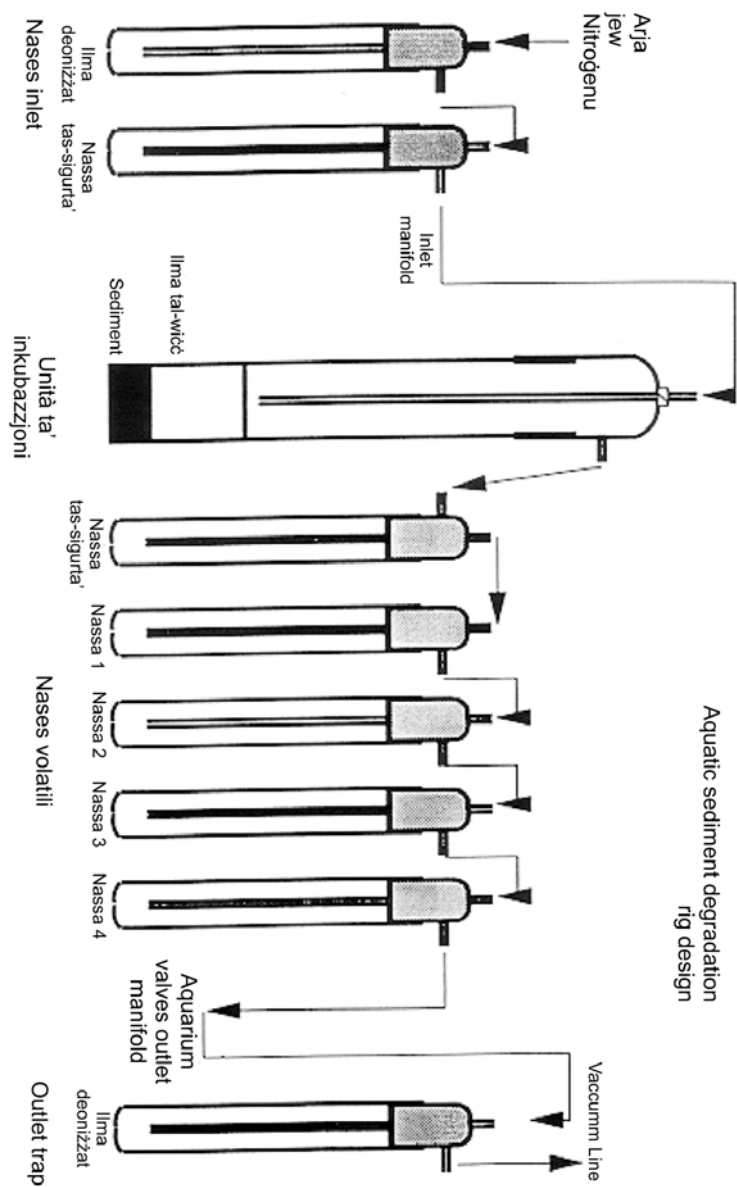
Għas-sistema tat-test anerobiku, il-proċedura tat-test hija essenzalment l-istess bħal dik elenkata għas-sistema erobika bl-eċċezzjoni li nitroġenu umidu jkun mogħddi minn fuq il-wiċċ ta' l-ilma f'kull unità ta' l-inkubazzjoni sabiex jinżamm spazju fil-wiċċ bin-nitroġenu. Is-sediment u l-ilma huma meqjusa bħala anerobiċi la darba l-potenzal tar-redox (E_h) ikun aktar baxx minn -100 mV.

Fit-test anerobiku, l-assaġġ tal-mineralizzazzjoni jinkludi l-kejl tad-diossidu tal-karbonu u tal-metanju evoluti.

▼B

ANNEX 2

EŻEMPJU TA' L-APPARAT TAN-NIXXIJA KONTINWA TAL-GASS



Nassa tas-sigurtà', vojta

Nassa 1:

ethyleneglycol biex jinqabdu l-volatili organiċi

Nassa 2:

Aċċu solforiku 0.1 M biex jinqabdu l-volatili alkalini

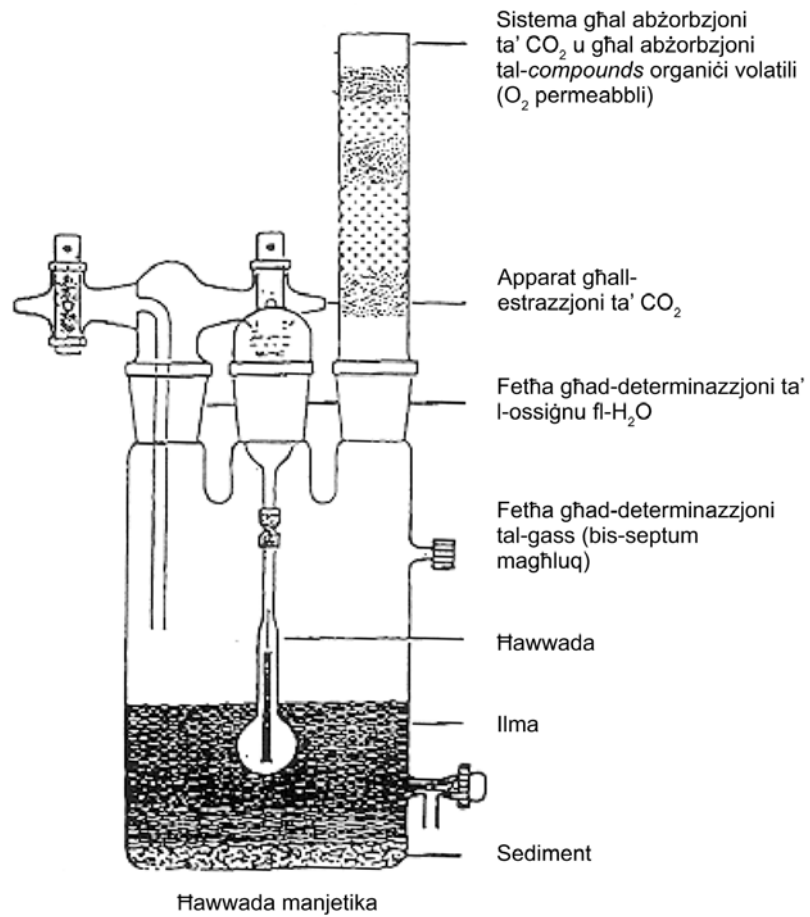
Nassa 3 & 4:

Sodju hydroxide 2M biex jinqabad CO₂ u volatili aċidi oħra

▼ B

ANNEX 3

EŻEMPJU TA' L-APPARAT BIOMETRIKU





ANNEX 4

**EŻEMPJU TAL-KALKOLU GHALL-APPLIKAZZJONI TA' DOŻA
MAR-REĊIPJENTI TAT-TEST**

Diametru intern taċ-ċildru: = 8 cm

Fond tal-kolonna ta' l-ilma li ma jinkludix is-sediment: = 12 cm

Iż-zona tal-wiċċ $3,142 \times 4^2$ = 50,3 cm²

Rata ta' l-applikazzjoni: 500 g sustanza tat-test/
ha tikkorrespondi għal 5 µg/cm²

Total µg: $5 \times 50,3$ = 251,5 µg

Aġġusta l-kantità b'relazzjoni mal-fond ta' 100 cm: = 30,18 µg
 $12 \times 251,5 \div 100$

Kolonna tal-volum ta' l-ilma: $50,3 \times 12$ = 603 ml

Konċentrazzjoni fl-ilma $30,18 \div 603$ = 0,050 µg/ml jew 50 µg/l

▼ M1

C.25. MINERALIZZAZZJONI LI TEHTIEĠ L-OSSIĠNU FL-ILMA TAL-WIČĊ — TEST TAS-SIMULAZZJONI TAL-BIODEGRADAZZJONI

1. METODU

Dan il-metodu hu ekwivalenti għall-*OECD* TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUZZJONI

L-iskop ta' dan it-test hu li jkejjel iż-żmien mehtieġ għall-bijodegradazzjoni ta' sustanza użata għat-test b'koncentrazzjoni baxxa fl-ilma naturali li jkun jehtieġ l-ossiġnu u biex jikkwantifika l-osservazzjonijiet f'forma ta' espressjonijiet tar-rata tal-moviment. Dan it-test simulatorju huwa test li jsir fil-laboratorju billi jiġi mħawwad vażett halli jkun magħrufa r-rati ta' bijodegradazzjoni li tehtieġ l-ossiġnu ta' sustanzi organiċi f'kampjuni ta' ilma naturali tal-wiċċ (frisk, f'it mielaħ jew ilma baħar). Hu bbażat fuq l-ISO/DIS 14592-1 (2) u jinkludi wkoll elementi mill-metodi tat-test Ċ.23 u Ċ.24 (3)(4). Hemm l-għażla li, b'ħinijiet twal tat-test, operazzjoni semi-kontinwa tiehu post l-operazzjoni fuq grupp sabiex tipprevjeni d-deterjorament tal-mikrokosmu taht test. L-ghan prinċipali tat-test simulatorju hu biex tkun magħrufa l-mineralizzazzjoni tas-sustanza użata għat-test fl-ilma tal-wiċċ, u l-mineralizzazzjoni hi l-bażi ta' kif tiġi espressa d-diżintegrazzjoni tal-movimenti. Madankollu, it-test jista' jkollu għan ieħor sekondarju biex tinkiseb informazzjoni dwar id-diżintegrazzjoni ewlenija u l-formazzjoni ta' prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni. L-identifikazzjoni ta' prodotti ta' trasformazzjoni, u fejn hu possibbli l-kwantifikazzjoni tal-koncentrazzjonijiet tagħhom, huma tassew importanti għal sustanzi li jiġu mineralizzati bil-mod ħafna (eż. fil-każ ta' nofs ħajjiet għas-sustanzi totali li jifdal wara l-evaporazzjoni ^{14}C li jaqbu is-60 gurnata). Koncentrazzjonijiet oġġla tas-sustanza użata għat-test (eż., $> 100 \mu\text{g/l}$) għandhom jintużaw normalment biex ikunu identifikati u kwantifikati prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri minhabba limitazzjonijiet analitiċi.

Koncentrazzjoni baxxa f'dan it-test tfisser konċentrazzjoni (eż. inqas minn $1 \mu\text{g/l}$ sa $100 \mu\text{g/l}$) li hi baxxa biżżejjed biex tiżgura li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni miksuba fit-test jirriflettu dawk li wiehed jistenna li jkun hemm fl-ambjent. Meta mqabbla mal-piż totali tas-sottostrati tal-karbonju bijodegradabbli li hemm fl-ilma naturali użat għat-test, is-sustanza użata għat-test b'koncentrazzjoni baxxa se sservi bħala sottostrata oħra. Dan jimplika li l-movimenti tal-bijodegradazzjoni antiċipati huma tal-ewwel ordni (movimenti "li ma jikbrux") u li s-sustanza użata għat-test tista' tiġi ddegradata permezz ta' "kometaboliżmu". Movimenti tal-ewwel ordni jimplikaw li r-rata tad-diżintegrazzjoni (mg/L/kull gurnata) hija proporzjonali mal-koncentrazzjoni tas-sottostrata li tonqos maż-żmien. Fil-każ tal-movimenti tal-ewwel ordni r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni speċifika, k , ma tiddependix fuq iż-żmien u l-koncentrazzjoni. Dan ifisser li, k ma tvarjax ħafna matul l-esperiment u lanqas tinbidel bil-koncentrazzjoni miżjuda waqt l-esperimenti. Skont id-definizzjoni, il-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni speċifika hija uguali għall-bidla relattiva fil-koncentrazzjoni biż-żmien: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Għalkemm wiehed jistenna li l-movimenti tal-ewwel ordni jkun normalment taht il-kundizzjonijiet preskritti, jista' jkun hemm ċerti ċirkustanzi fejn movimenti oħra huma aktar addattati. Id-devjazzjonijiet mill-movimenti tal-ewwel ordni jistgħu eż. jiġu osservati jekk il-fenomeni tat-trasferiment tal-piż bħar-rata tat-tifrix, aktar milli r-rata tar-razzjoni bijoloġika, tkun qed tillimita r-rata tal-bijotrasformazzjoni. Madankollu, id-data tista' kważi dejjem tkun deskritta minn movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebhu li jaċċettaw kostanti tar-rata ta' konċentrazzjoni dipendenti.

▼ **M1**

Informazzjoni dwar il-bijodegradabbiltà tas-sustanza użata għat-test f'koncentrazzjonijiet oghla (eż. mit-testijiet standard ta' *screening*) kif ukoll informazzjoni dwar id-degradabbiltà li mhix ta' natura bijoloġika, prodotti ta' trasformazzjoni u karatteristiċi fiżiko-kemikali rilevanti għandhom ikunu disponibbli qabel it-test biex ikun jista' jiġi stabbilit l-ippjanar esperimentali u jiġu interpretati r-risultati. L-użu ta' sustanzi għat-test imsemmija ^{14}C u l-għarfien tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C fl-aħħar tat-test, għandhom jgħinu biex tkun maghrufa l-bijodegradabbiltà finali. Meta tkun użata sustanza għat-test li ma ngħatatx isem, il-bijodegradazzjoni finali tista' tkun stmata biss jekk tiġi ttestjata konċentrazzjoni oghla u l-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri kollha jkunu maghrufa.

1.2. DEFINIZZJONIJIET

Bijodegradazzjoni primarja: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganizmi li twassal biex tintilef l-identità kimika.

Bijodegradazzjoni funzjonali: Il-bidla strutturali (trasformazzjoni) ta' sustanza kimika mill-mikroorganizmi li twassal biex tintilef karatteristika speċifika.

Bijodegradazzjoni li tkun tehtieg l-ossigenu finali: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika mill-mikroorganizmi meta jkun hemm l-ossigenu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali u xi elementi ohra (mineralizzazzjoni) preżenti u l-holqien tal-piż totali ta' l-organizmi u prodotti organiċi li fihom bijosinteżi tal-mikroorganizmi godda.

Mineralizzazzjoni: Id-diżintegrazzjoni ta' sustanza kimika f'materja organika minhabba l-mikroorganizmi li hemm fl-ossigenu mal-karbonju diossidu, l-ilma u l-melħ minerali ta' xi elementi ohra preżenti.

Fażi tad-dewmien: Il-hin minn meta jibda test sakemm jintlaħaq l-addattament tad-degradar tal-mikroorganizmi u l-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika żdied għal livell li jista' jkun maghruf (eż. 10 % tal-bijodegradazzjoni teoretika massima, jew inqas, jiddependi minn kemm hi preċiża t-teknika tal-kejl).

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni: L-ammont ta' bijodegradazzjoni ta' sustanza kimika jew materja organika f'test, irrekordjata f'percentwal, li 'l fuq minnu ma ssirx aktar bijodegradazzjoni waqt it-test.

Sottostrata primarja: Ġabra ta' karbonju naturali u sorsi ta' enerġija li jkabbru u jzommu l-piż totali tal-organizmi mikrobjali.

Sottostrata sekondarja: Komponent tas-sottostrata li hemm f'dik il-koncentrazzjoni baxxa, li bid-diżintegrazzjoni tiegħu, ammonti żgħar hafna ta' karbonju u enerġija jiġu mgħoddija lill-mikroorganizmi kompetenti, meta mqabbla mal-karbonju u l-enerġija mogħtija mid-diżintegrazzjoni tal-komponenti tas-sottostrata ewlenija (sottostrati primarji).

Ir-rata tad-diżintegrazzjoni kostanti: Rata tal-moviment kostanti tal-ewwel ordni jew li tixbahha, k (d^{-1}), li tindika r-rata tal-proċessi tad-diżintegrazzjoni. Għal esperiment fuq grupp k hi stmata mill-parti tal-bidu tal-kurva tad-diżintegrazzjoni miksuba wara li tintemm il-fażi tad-dewmien.

Nofs hajja, $t_{1/2}$ (d): Terminu użat biex jikkaratterizza r-rata tar-reazzjoni tal-ewwel ordni. Hu l-intervall tal-hin li jikkorrispondi għal tnaqqis fil-koncentrazzjoni b'fattur 2. In-nofs hajja u l-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni huma marbuta ma' l-ekwazzjoni $t_{1/2} = \ln 2/k$.

▼ **M1**

Il-brejk tad-dizintegrazzjoni, DT_{50} (d): Terminu użat biex jikkwantifika r-riżultat tat-testijiet tal-bijodegradazzjoni. Huwa l-intervall ta' hin, inkluż il-fażi tad-dewmien, mehtieg biex jintlahaq valur ta' 50 % bijodegradazzjoni.

Il-limitu tal-gharfien (LOD) u l-limitu tal-kwantifikazzjoni (LOQ): Il-limitu tal-gharfien (LOD) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-identità tas-sustanza ma tkunx tista' tintgħaraf mill-karatteristiċi li ddaħhlu fil-preparazzjoni għall-analizi. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza li 'l isfel minnu l-konċentrazzjoni ma tistax tkun magħrufa bi preċiżjoni aċċettabbli.

Karbonju organiku mahlul fl-ilma (DOC): Dik il-parti tal-karbonju organiku f'kampjun ta' ilma li ma tistax titneħħa b'fażi ta' separazzjoni speċifika, per eżempju b'azzjoni ċentrifuga permezz ta' magna f'40 000 ms^{-2} għal 15-il min jew bl-iffiltrar tal-membrana billi jintużaw membrani li fihom pori b'dijametru ta' 0,2 μm -0,45 μm .

L-attività organika ^{14}C totali (TOA): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku.

L-attività organika ^{14}C mahlula fl-ilma (DOA): L-attività totali organika ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku mahlul fl-ilma.

L-attività organika ^{14}C f'forma ta' partikuli separati (POA): L-attività totali ^{14}C assoċjata mal-karbonju organiku f'forma ta' partikuli separati.

1.3. APPLIKABILITÀ TAT-TEST

Dan it-test simulatorju japplika għal sustanzi organiċi li ma jevaporawx malajr jew jevaporaw xi ftit malajr ittestjati f'konċentrazzjonijiet baxxi. Permezz ta' fliexken miftuħa għall-arja (eż. tajjar imdeffes), sustanzi bil-kostanti tar-regola ta' Henry inqas minn madwar 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (madwar $10^{-5} atm \cdot m^3/mol$) jistgħu jitqiesu li ma jevaporawx malajr fil-prattika. Permezz ta' fliexken magħluqa bl-ispazju fuq, hu possibbli li jiġu ttestjati sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr (bil-kostanti tar-regola ta' Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ jew < $10^{-3} atm \cdot m^3/mol$) mingħajr telf fis-sistema tat-test. Jista' jkun hemm telf tas-sustanzi msejha ^{14}C , jekk ma jittiehdux il-prekawzjonijiet ġusti, meta jitneħħa s- CO_2 . F'dawk is-sitwazzjonijiet, jista' jkun hemm bżonn li s- CO_2 jinqabad go assorbitur intern bl-alkali jew li tintuża sistema esterna li tassorbi s- CO_2 (gharfien dirett tal- $^{14}CO_2$; ara Anness 3). Biex ikunu magħrufa l-movimenti tal-bijodegradazzjoni, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza użata għat-test iridu jkunu taħt meta tinħall fl-ilma. Ta' min jinnota, iżda, li l-valuri tal-letteratura ta' meta jinħall fl-ilma jistgħu jkunu oghla sew minn meta tinħall is-sustanza użata għat-test fl-ilmijiet naturali. Hemm l-għażla li tiġi stabbilita s-solubilità ta' sustanzi tat-test partikolari li ma tantx jinħallu fl-ilma permezz tal-ilmijiet naturali li jkunu qed jiġu ttestjati.

Il-metodu jista' jkun użat biex tiġi simulata l-bijodegradazzjoni fl-ilma tal-wiċċ li ma jkunx fih partikuli horox ("test li jsir fil-baħar miftuħ") jew fil-wiċċ tal-ilma mhux ċar, eż. li jista' jkun hemm hdejn post fejn l-ilma jiltaqa' man-naqal ("test sospiż tan-naqal").

▼ M1

1.4. IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

It-test isir fi grupp billi s-sustanza użata għat-test tiġi żviluppata fiha l-batteri jew mill-ilma tal-wiċċ biss (“test li jsir fil-baħar miftuħ”) jew ilma miżjud b’solidi/naqal miżmuma x’imkien bejn il-qiegh u fuq ta’ 0,01 sa 1g/L użin xott (“test sospiż” tan-naqal biex ikun jixbah *body* tal-ilma miżmuma x’imkien bejn il-qiegh u fuq jew naqal li jerga’ jkun sospiż bejn il-qiegh u fuq. Is-solidi miżmuma x’imkien bejn il-qiegh u fuq/il-koncentrazzjoni tan-naqal fil-firxa t’isfel ta’ dan l-intervall hi tipika għal hafna ilmiġiet fil-wiċċ. Il-fliexken tat-test tiżviluppata fihom batteri fid-dlam f’temperatura ambjentali taħt kundizzjonijiet li jehtieġu l-ossigenu u l-aġitazzjoni. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test għandhom jintużaw sabiex jiġu ddeterminati l-movimenti tad-dizintegrazzjoni. Il-koncentrazzjonijiet għandhom ivarjaw minn xulxin b’fattur ta’ 5 sa 10 u għandhom jirrapprezentaw il-firxa mistennija ta’ konċentrazzjonijiet fl-ambjent. Il-koncentrazzjoni massima tas-sustanza tat-test m’għandhiex teċċedi 100 µg/L, iżda l-koncentrazzjonijiet massimi tat-test taħt 10 µg/L jew inqas huma preferuti biex ikun żgurat li l-bijodegradazzjoni ssegwi l-movimenti tal-ewwel ordni. L-ibaxx konċentrazzjoni m’għandhiex teċċedi 10 µg/L, iżda l-ibaxx konċentrazzjonijiet tat-test ta’ 1-2 µg/L jew inqas minn 1 µg/L huma preferuti. Normalment analiżi adegwata ta’ dik il-koncentrazzjoni baxxa tista’ tintlaħaq bl-użu ta’ sustanzi msejha ¹⁴C li ssib tixtrihom. Minhabba l-limitazzjonijiet analitiċi, ta’ spiss ikun impossibbli li titkejjel il-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test bil-preċiżjoni meħtieġa, jekk is-sustanza tat-test hi applikata f’koncentrazzjoni ta’ ≤ 100 µg/L (ara t-tieni paragrafu f’sezzjoni 1.7.2.). Konċentrazzjonijiet oghla ta’ sustanzi użati għat-test (> 100 µg/L u xi kultant > 1 mg/L) jistgħu jintużaw għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni ta’ prodotti ta’ trasformazzjoni maġġuri jew jekk m’hemmx metodu ta’ analiżi speċifiku b’limitu baxx li jidditektja. Jekk ikunu ttestjati konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, jista’ ma jkunx possibbli li r-riżultati jintużaw biex tkun stmata l-kostanti tad-dizintegrazzjoni tal-ewwel ordni u n-nofs haġja, għax id-dizintegrazzjoni probabbilment ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni.

Id-dizintegrazzjoni tkun segwita f’intervalli tal-hin addattati, billi titkejjel jew is-sustanza li jkun fadal wara l-evaporazzjoni ¹⁴C jew il-koncentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test meta tintuża analiżi kimika speċifika. L-ghoti tal-isem ¹⁴C tal-aktar parti stabbli tal-molekula jiżgura li tkun determinata l-mineralizzazzjoni totali, filwaqt li l-ghoti ta’ l-isem ¹⁴C ta’ parti inqas stabbli tal-molekula, kif ukoll l-użu ta’ analiżi speċifika, jagħti lok għal evalwazzjoni tal-bijodegradazzjoni primarja biss. Madankollu, l-aktar parti stabbli mhux neċessarjament tinkludi n-nofs funzjonali rilevanti tal-molekula (li tista’ tkun relatata ma’ karatteristika speċifika bħat-tossicità, il-bijoakkumulazzjoni, eċċ.) Jekk hekk ikun il-każ, ikun xieraq li tintuża sustanza tat-test, imsemmija ¹⁴C, fil-parti funzjonali sabiex issegwi t-tneħħija tal-karatteristika speċifika.

1.5. INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

Kemm is-sustanzi tat-test li ġew immarkati permezz ta’ raġġi (*radio-labelled*) kif ukoll dawk li ma ġewx mogħtija isem jistgħu jintużaw f’dan it-test. It-teknika tal-ghoti tal-isem ¹⁴C hi rakkomandata u l-ghoti tal-isem għandu jsir normalment fl-aktar parti(jiet) stabbli tal-molekula (ara anki sezzjoni 1.4.). Għal sustanzi li fihom aktar minn ċirku li mhux saturizzat bl-umdità, karbonju wiehed jew aktar f’kull ċirku għandu preferibbilment ikun mogħti l-isem ¹⁴C. Barra minn hekk, karbonju wiehed jew aktar fuq iż-żewġ naħat ta’ għaqdiet li jistgħu jiġu dizintegrati faċilment għandhom preferibbilment ikollhom l-isem ¹⁴C. Il-purità kimika u/jew radjokimika tas-sustanza tat-test għandha tkun > 95 %. Għal sustanzi mmarkati permezz ta’ raġġi, attività speċifika ta’ madwar 50 µCi/mg (1,85 MBq) jew aktar hi preferuta sabiex tiffaċilita l-kejl ¹⁴C f’testijiet li jsiru b’koncentrazzjonijiet baxxi fil-bidu. Għandu jkun hemm l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza użata għat-test:

▼ **M1**

- is-solubilità fl-ilma [Metodu A6];
- is-solubilità f'agent(i) organiku li jinhall (sustanzi applikati bl-agent li jinhall jew li ma tantx jinhallu fl-ilma);
- il-kostanti dikompost (pKa) jekk is-sustanza għandha tendenza għal *protonation* jew *deprotonation* [OECD TG 112] (5);
- il-prepressjoni tal-fwar [Metodu A.4] u l-ligi ta' *Henry* kostanti;
- stabbilità kimika fl-ilma u fid-dlam (idrolisi) [Metodu C.7].

Meta sustanzi li ma tantx jinhallu fl-ilma jkunu qed jiġu ttestjati fl-ilma baħar, ta' min ikun jaf il-kostanti tat-tnehhija tal-melħ (jew "il-kostanti *Setschenow*") K^s , li huma mfissra permezz tal-espressjoni: $\log (S/S') = K^s C_m$, fejn S u S' huma kemm tinhall is-sustanza fl-ilma pur u l-ilma baħar, rispettivament, u C_m hija l-konċentrazzjoni *molar* tal-melħ.

Jekk it-test isir bħala "test tan-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegħ u fuq" l-informazzjoni li ġejja għandha tkun disponibbli:

- koefċijent tad-diviżjoni *n-octanol*/ilma [Metodu A.8];
- koefċijent ta' kemm il-molekuli jzommu fil-wieċ ta' likwidu (*absorption coefficient*) [Metodu C.18];

Informazzjoni oħra utli tista' tinkludi:

- il-konċentrazzjoni ambjentali, jekk tkun magħrufa jew stmata;
- it-tossicità tas-sustanza użata għat-test għall-mikroorganizmi [Metodu C.11];
- bijodegradabbiltà lesta u/jew li teżisti fiha [Metodi C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];
- studji dwar il-bijodegradabbiltà li tehtieg l-ossigenu fl-ilma jew li ma tehtiegx ossigenu fil-ħamrija u fil-bidla tan-naqal/l-ilma [Metodi C.23, C.24].

1.6. SUSTANZA UŻATA BĦALA REFERENZA

Sustanza, li tista' tiddizintegra faċilment f'kundizzjonijiet li jkunu jehtiegu l-ossigenu fl-ilma (eż. l-*aniline* jew *is-sodium benzoate*) għandha tintuża bħala sustanza ta' referenza. L-intervall ta' ħin mistenni għad-dizintegrazzjoni tal-*aniline* u tas-*sodium benzoate* huwa normalment inqas minn ġimagħtejn. L-iskop tas-sustanzi użati bħala referenza hu li jkun żgurat li l-attività tal-mikroorganizmi ta' l-ilma użat għat-test hi f'certi limiti; jiġifieri li l-ilma fih popolazzjoni attiva ta' mikroorganizmi.

▼ **M1**

1.7. KRITERJI DWAR IL-KWALITA'

1.7.1. **Irkuprar**

Hekk kif tiġi miżjuda s-sustanza użata għat-test, kull test tal-konċentrazzjoni tal-bidu għandu jiġi vverifikat billi titkejjel l-attività ^{14}C , jew permezz ta' analiżi kimika fil-każ ta' sustanzi li m'għandhomx isem, f'tal-inqas kampjuni doppji. Dan jagħti informazzjoni dwar kemm għandu jkun applikat u kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku kif ukoll dwar kemm hu uniformi t-tqassim tas-sustanza użata għat-test. Normalment, l-attività ^{14}C inizjali jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jintużaw fl-analiżi sussegwenti tad-data aktar milli l-konċentrazzjoni nominali bħala telf minhabba *sorption* u żbalji fid-daqs tad-dożi jiġu kumpensati. Għas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C , il-livell ta' irkuprar fl-aħħar tal-esperiment hu mogħti bil-bilanċ fil-piż (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Idealment, il-bilanċ tal-piż immarkat permezz ta' raġġi għandu jstendi minn 90 % għal 110 %, filwaqt li l-preċiżjoni analitika għandha twassal għal irkuprar tal-bidu bejn 70 % u 110 % għal sustanzi tat-test li m'għandhomx isem. Dawn il-firxiet għandhom ikunu interpretati bħala miri u m'għandhomx jintużaw bħala kriterji biex jiġi aċċettat it-test. Il-preċiżjoni analitika tista' tiġi ddeterminata ukoll għas-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni ibaxx mill-konċentrazzjoni tal-bidu u għall-prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri.

1.7.2. **Kemm għandu jiġi mtenni u kemm hu sensittiv il-metodu analitiku**

Kemm għandu jiġi mtenni l-metodu analitiku (inkluż l-effiċjenza tal-estrazzjoni tal-bidu) biex tiġi kwantifikata s-sustanza tat-test, u l-prodotti ta' trasformazzjoni, jekk jixraq, għandu jkun iċċekkjat billi jkun hemm hames analiżi l-istess tal-estratti individwali tal-ilma tal-wiċċ.

Il-limitu ta' għarfien (*LOD*) tal-metodu analitiku għas-sustanza użata għat-test u għall-prodotti ta' trasformazzjoni għandu jkun tal-inqas 1 % tal-ammont tal-bidu applikat lis-sistema tat-test jekk hu possibbli. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) għandu jkun daqs jew inqas minn 10 % tal-konċentrazzjoni applikata. L-analiżi kimika ta' hafna sustanzi organiċi u l-prodotti tat-trasformazzjoni tagħhom ta' spiss jeħtieġu li s-sustanza użata għat-test tkun applikata f'konċentrazzjoni kemm xejn għolja, jiġifieri $> 100 \mu\text{g/L}$.

1.8. DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST

1.8.1. **Tagħmir**

It-test jista' jsir fi fliexken forma ta' lembut jew forma ta' ċilindru tad-daqs addattat (eż. li jesgħu 0,5 jew 1,0 litru) magħluqa b'tappijiet tas-silikon jew lastku, jew fi fliexken tas-*serum* b'għotjien li ma johroġx minnhom CO_2 (eż. b'għeluq tal-lastku sintetiku). Inkella t-test jista' jsir bl-użu ta' hafna fliexken u bl-osservazzjoni tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha, ta' l-inqas darbtejn, f'kull intervall tal-kampjuni (ara l-aħħar paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1). Għas-sustanzi tat-test li ma jevaporawx malajr u li mhumiex immarkati bir-raġġi, m'hemmx bżonn ta' tappijiet jew għotjien li ma johroġx gass minnhom; biċċiet tat-tajjar li ma jagħtux lok li jkun hemm kontaminazzjoni mill-arja huma addattati (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.). Sustanzi li ma tantx jevaporaw malajr għandhom ikunu ttestjati f'sistema tat-tip tal-*bijometer* billi jithawwad bil-mod l-ilma tal-wiċċ. Biex ikun żgurat li ma ssirx kontaminazzjoni mill-batterji, il-kontenituri jistgħu jiġu sterilizzati billi jissahħnu jew jiġu stimjati qabel ma jintużaw. Barra minn hekk, it-tagħmir standard tal-laboratorju li ġej huwa użat:

— mejda li tittriegħed jew oġġetti li jhalltu manjetiċi biex ikun hemm ċaqliq kontinwu tal-fliexken użati għat-test,

▼ **M1**

- magna ċentrifuga,
- pH meter,
- *turbidimeter* biex ikejjel konċentrazzjoni tal-frak tat-tajn,
- forn jew majkrowejv biex ikun maghruf il-piż xott,
- apparat li jissepara l-membrana,
- sterilizzatur li juża' stim bi pressjoni għolja jew forn biex jisterilizza bis-shana l-kontenituri tal-ħġieġ,
- faċilitijiet biex jimmaniġġjaw is-sustanzi mmarkati ^{14}C ,
- tagħmir biex tiġi kwantifikata l-attività ^{14}C f'kampjuni mit-tahlitiet li jaqbd u s-CO_2 u, jekk hemm bżonn, mill-kampjuni tan-naqal,
- tagħmir analitiku biex tkun magħrufa s-sustanza użata għat-test (jew is-sustanza ta' referenza) jekk tintuża' analiżi kimika speċifika (eż. dak li jifred il-gass f'tahlita, dak li jifred il-likwidu bi pressjoni għolja).

1.8.2. **Tahlitiet tal-kwantità tas-sustanza tat-test**

Ilma mingħajr *ions* użat biex jiġu ppreparati t-tahlitiet tal-kwantità tat-test u s-sustanzi ta' referenza (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.7). L-ilma mingħajr *ions* m'għandux ikun fih sustanzi li jistgħu jkunu tossiċi għall-mikroorganizmi, u l-karbonju organiku mahlul fl-ilma (*DOC*) m'għandux ikun aktar minn 1 mg/L (6).

1.8.3. **Ġbir u garr tal-ilma tal-wiċċ**

Il-post fejn jittiehdu l-kampjuni għall-ġbir tal-ilma tal-wiċċ għandu jintgħażel skont l-għan tat-test f'kull sitwazzjoni partikolari. Meta jintgħażlu l-postijiet fejn għandhom jittiehdu l-kampjuni, għandha titqies l-istorja ta' kontribut agrikolu, industrijali jew domestiku li jista' jkun hemm. Jekk ikun magħruf li ambjent akwatiku gie kkontaminat bis-sustanza tat-test jew l-analogu strutturali tagħha fl-erba' snin ta' qabel, m'għandux jintuża' għall-ġbir ta' ilma għat-test, sakemm l-investigazzjoni tar-rati ta' dizintegrazzjoni f'postijiet li kienu esposti qabel huwa l-għan dikjatur ta' l-investigatur. Il-*pH* u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu mkejla fil-post tal-ġbir. Barra minn hekk, il-fond tat-tehid tal-kampun u d-dehra tal-kampjun tal-ilma (eż. kulur u nuqqas ta' ċarezza) għandhom jiġu nnutati (ara sezzjoni 3). Il-konċentrazzjoni tal-ossiġnu u/jew il-potenzjal tal-ossi-dazzjoni u t-tnaqqis fl-ilma u fis-saff tan-naqal tal-wiċċ għandu jitkejjel sabiex juri l-kundizzjonijiet li jehtieġu l-ossiġnu fl-ilma sakemm dan ma jkunx ovvju mid-dehra u mill-esperjenza storika tal-post. L-ilma tal-wiċċ għandu jingarr f'kontenitur li hu mnaddaf sew. Waqt il-garr, it-temperatura tal-kampjun m'għandhiex teċċedi b'mod sinifikanti t-temperatura użata fit-test. Hu rakkomandat li tiġi mkessha għal temperatura ta' 4 °C waqt il-garr jekk idum aktar minn 2 jew 3 sigħat. Il-kampjun tal-ilma m'għandux ikun iffriztat.

▼ **M1****1.8.4. Il-ħżin u l-preparazzjoni tal-ilma tal-wiċċ**

It-test għandu jibda preferibbilment fi żmien ġurnata wara li jingabar il-kampjun. Il-ħżin tal-ilma, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u għall-ebda raġuni m'għandu jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat. Il-kampjun tal-ilma għandu jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat b'gas sakemm jintuża. Qabel ma jintuża, il-partijiet l-irraq horox għandhom jitnehhew, eż. billi jiġu iffiltrati minn go filter tan-najlon li x-xibka tiegħu tkun daqs 100 µm jew b'filter tal-karta hoxna, jew billi jithalla joqghod halli n-naqal jinżel fil-qiegh.

1.8.5. Il-preparazzjoni tal-ilma miżjud bin-naqal (mhux obbligatorja)

Għat-test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegh u l-wiċċ, in-naqal tal-wiċċ jiġi miżjud fil-fliexken li fihom ilma naturali (iffiltrat biex jitnehhew il-frak horox kif deskritt fis-sezzjoni 1.8.4.) biex tinkiseb is-sospensjoni; il-konċentrazzjoni ta' solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegh u fuq għandha tkun bejn 0,01 u 1 g/L. In-naqal tal-wiċċ għandu jkun ta' l-istess post minn fejn ittieded il-kampjun ta' l-ilma. Skont l-ambjent akwatiku partikulari, in-naqal tal-wiċċ jista' jew ikun karatterizzat minn kontenut għoli ta' karbonju organiku (2.5-7.5 %) u konsistenza fina jew minn kontenut baxx ta' karbonju organiku (0.5-2.5 %) u konsistenza harxa (3). In-naqal tal-wiċċ jista' jiġi preparat kif ġej: hu diversi biċċiet min-nofs tan-naqal billi tuża tubu trasparenti tal-plastik, nehħilu s-saffi ta' fuq li jehtiegu l-ożiġnu (mill-wiċċ sa fond ta' massimu ta' 5 mm) eżatt wara li jittieded il-kampjun u itfagħhom flimkien. Il-kampjun li johroġ tan-naqal għandu jingarr go kontenitur li l-parti ta' fuq tiegħu hi kbira biżżejjed għall-arja biex iżomm lin-naqal f'kundizzjonijiet li jehtiegu l-ożiġnu (kesshu għal 4 °C jekk il-ġarr idum aktar minn 2-3 sigħat). Il-kampjun tan-naqal għandu jinżamm bejn il-qiegh u l-wiċċ fl-ilma tat-test fi proporzjon ta' 1:10 u jinżamm f'temperatura ta' 4 °C iċċarġjat bil-gass sakemm jintuża. Il-ħżin tan-naqal, jekk hemm bżonn, għandu jkun minimizzat u m'għandux jaqbeż massimu ta' 4 ġimgħat.

1.8.6. Proċedura semi-kontinwa (mhux obbligatorja)

L-inkubazzjoni fit-tul (diversi xhur) tista' tkun mehtieġa jekk il-perjodu tad-dewmien isir qabel ma tkun tista' titkejjel diżintegrazzjoni sinifikanti tas-sustanza tat-test. Jekk din tkun magħrufa minn testijiet imġhodidja tas-sustanza, it-test jista' jinbada permezz tal-proċedura semi-kontinwa, li tagħti lok għal tiġdid perjodiku ta' parti mill-ilma tat-test jew mis-sospensjoni (ara Anness 2). Inkella, it-test normali fuq grupp jista' jinbidel b'test semi-kontinwu, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test intlaħqet matul madwar 60 ġurnata ta' testjar billi ntuzat il-proċedura tal-grupp (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.8.3).

1.8.7. Żieda tas-sustanza tat-test (jew ta' referenza)

Għal dawk is-sustanzi li jinhallu malajr fl-ilma ($> 1 \text{ mg/L}$) u jevaporaw ftit (bir-regola ta' *Henry* kostanti $< 1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ jew $< 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$), tahlita tal-kwantità tista' tiġi ppreparata fl-ilma mingħajr *ions* (ara sezzjoni 1.8.2); il-volum addattat tal-kwantità jiġi miżjud fil-kontenituri tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni mixtieqa. Il-volum ta' xi kwantità tat-tahlita għandu jkun il-minimu prattiku ($< 10 \%$ tal-volum tal-likwidu finali, jekk jista' jkun). Proċedura oħra hi li s-sustanza tat-test tiġi mahlula f'volum akbar ta' ilma tat-test, li tista' tidher bħala alternattiva għall-użu ta' agenti organiċi li jinhallu.

▼ **M1**

Jekk ma jkunx possibbli, it-tahlitiet tal-kwantità ta' sustanzi li ma jevaporawx malajr u li ma jinhallux malajr fl-ilma għandhom ikunu preparati permezz ta' aġent organiku li jinhall u li jevapora malajr, iżda l-ammont tal-aġent li jinhall miżjuda mas-sistema tat-test m'għandux jeċċedi il-1 % v/v u m'għandux iħalli effetti ħżiena fuq l-attività tal-mikroorganizmi. L-aġent li jinhall m'għandux jaffettwa l-istabbiltà tas-sustanza tat-test fl-ilma. L-aġent li jinhall m'għandux jitneħħa fi kwantità żgħira tant li ma żżidx b'mod sinifikanti l-koncentrazzjoni *DOC* ta' l-ilma tat-test jew is-sospensjoni. Dan għandu jkun iċċekkjat bl-analiżi tas-sustanza speċifika jew, jekk jista' jkun, permezz ta' analiżi *DOC* (6). Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi llimitat l-ammont ta' aġent li jinhall trasferit għal dak li hu assolutament neċessarju, u biex ikun żgurat li l-ammont tas-sustanza tat-test tista' tinhall fil-volum finali ta' l-ilma tat-test. Jistgħu jintużaw tekniki oħra biex tiddaħhal is-sustanza tat-test fil-kontenituri tat-test kif deskritt f'(7) u (8). Meta aġent organiku li jinhall jintuża għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, il-kontrolli tal-aġent li jinhall li fihom l-ilma tat-test (mingħajr zidiet) u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza miżjuda għandhom ikunu ttrattati bl-istess mod bħall-kontenituri attivi tat-test miżjuda bis-sustanza tat-test f'dak li jgħorr l-aġent li jinhall. L-iskop tal-kontrolli tal-aġent li jinhall hu biex jiġu eżaminati xi effetti negattivi li jistgħu jkunu kkawżati mill-aġent li jinhall fuq il-popolazzjoni tal-mikroorganizmi kif indikat mid-dizintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

1.8.8. **Kundizzjonijiet tat-test**1.8.8.1. *Temperatura tat-test*

L-inkubazzjoni għandha ssir fid-dlam (preferibbilment) jew f'dawl batut b'temperatura kkontrollata (± 2 °C), li tista' tkun it-temperatura tal-esperiment jew it-temperatura standard ta' 20-25 °C. It-temperatura tal-esperiment tista' tkun jew it-temperatura proprja tal-kampjun ta' meta jittiehed il-kampjun jew it-temperatura medja tal-esperiment fil-post fejn jittiehed il-kampjun.

1.8.8.2. *Ċaqliq*

Iċ-ċaqliq permezz ta' ċaqliq jew thawwid kontinwu għandu jsir biex il-partikuli ż-żgħar u l-mikroorganizmi jkunu miżmuma xi mkien bejn il-qiegh u l-wiċċ. Iċ-ċaqliq jgħin ukoll biex jiġi trasferit l-ossigenu mill-parti ta' fuq għal-likwidu sabiex il-kundizzjonijiet fejn ikun meħtieġ l-ossigenu jistgħu jinżammu b'mod adegwat. Qieghed il-fliexken fuq mejda li titriegħed (madwar 100 rpm ta' ċaqliq) jew uża xi haġa manjetika biex thawwad. Iċ-ċaqliq irid ikun kontinwu. Izda, iċ-ċaqliq jew it-thawwid għandu jsir bil-mod kemm jista' jkun, filwaqt li jinżamm f'livell uniformi x'imkien bejn il-qiegh u l-wiċċ.

1.8.8.3. *Tul tat-test*

It-test m'għandux idur aktar minn 60 jum sakemm ma tkunx qed tiġi applikata l-proċedura semi-kontinwa bit-tigdid perjodiku tat-test ta' sospensjoni (ara sezzjoni 1.8.6 u Anness 2). Madankollu, il-perjodu tat-test għat-test tal-grupp jista' jkun estiz għal massimu ta' 90 ġurnata, jekk id-dizintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 jum. Id-dizintegrazzjoni hi monitorjata, f'intervalli tal-hin addattati, billi tkun magħrufa l-attività ^{14}C tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni jew $^{14}\text{CO}_2$ evolut (ara sezzjoni 1.8.9.4) u/jew permezz ta' analiżi kimika (sezzjoni 1.8.9.5). Il-hin tal-inkubazzjoni għandu jkun twil biżżejjed biex jevalwa l-proċess ta' dizintegrazzjoni. L-ammont ta' dizintegrazzjoni preferibbilment għandu jeċċedi 50 %; għas-sustanzi li jiddizintegraw bil-mod, l-ammont ta' dizintegrazzjoni għandu jkun biżżejjed (normalment aktar minn 20 % dizintegrazzjoni) sabiex jiżgura li tiġi stmata r-rata kostanti ta' dizintegrazzjoni tal-moviment.

▼ **M1**

Kejl perjodu tal-*pH* u l-konċentrazzjoni tal-ossigenu fis-sistema tat-test għandu jsir sakemm dan ma jkunx mehtieg minhabba esperjenzi mgħoddija minn testi simili bil-kampjuni ta' l-ilma u n-naqal miġbura mill-istess post. Taht xi kundizzjonijiet, il-metaboliżmu tas-sottostrati primarji f'konċentrazzjonijiet aktar għolja fl-ilma jew in-naqal jistgħu jwasslu għall-evoluzzjoni biżżejjed tas-CO₂ u t-tnehhija tal-ossigenu biex li jbiddu b'mod sinifikanti l-kundizzjonijiet sperimentali waqt it-test.

1.8.9. **Il-Proċedura**1.8.9.1. *Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test fil-baħar miftuħ*

Ittrasferixxi volum addattat ta' ilma tat-test fil-fliexken tat-test, sa qisu terz tal-volum tal-fliexkun u mhux anqas minn madwar 100 ml. Jekk jintużaw diversi fliexken (biex ikunu jistgħu jiġu magħrufa l-konsegwenzi tal-fliexken kollha kull meta jittiehdu l-kampjuni), il-volum addattat tal-ilma tat-test hu kwazi wkoll ta' madwar 100 ml, għaliex volumi żgħar tal-kampjuni jistgħu jinfluwenzaw it-tul tal-fażi tad-dewmien. Is-sustanza tat-test hi miżjuda mit-tahlita tal-kwantità kif deskritta fis-sezzjonijiet 1.8.2 u 1.8.7. Tal-inqas żewġ konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test li jvarjaw b'fattur ta' 5 sa 10 għandhom jintużaw sabiex ikunu magħrufa l-movimenti tad-dizintegrazzjoni u biex tiġi kalkolata r-rata kostanti tad-dizintegrazzjoni tal-moviment. Iz-żewġ konċentrazzjonijiet magħżula għandhom ikunu inqas minn 100 µg/L u preferibbilment inqas minn < 1-10 µg/L.

Aghlaq il-fliexken bit-tappijiet jew għotjien li minnhom ma tistax tgħaddi arja u CO₂. Għall-kimiċi tat-test li ma jevaporawx ta' ¹⁴C li m'għandhomx isem, biċċiet tat-tajjar huma addattati biex jintużaw bhala tappijiet biex jevitaw kontaminazzjoni mill-arja (ara sezzjoni 1.8.1) dejjem jekk xi prodotti maġġuri ta' dizintegrazzjoni huma magħrufa li ma jevaporawx, u jekk tintuża' determinazzjoni tas-CO₂ indiretta (ara Anness 3).

Inkuba l-fliexken fit-temperatura magħżula (ara sezzjoni 1.8.8.1). Nehhi l-kampjuni għall-analiżi kimika jew il-kejl ¹⁴C fil-bidu tat-test (jiġifieri qabel ma tibda d-dizintegrazzjoni; ara sezzjoni 1.7.1) u mbagħad f'intervalli tal-hin addattati matul it-test. It-tehid tal-kampjuni jista' jsir billi jitnehhew is-sotto kampjuni (eż. 5 ml tal-kampjuni) minn kull repetizzjoni tal-esperiment jew permezz tal-esperjenza tal-konsegwenzi tal-fliexken kollha meta jittiehdu l-kampjuni. Il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test tista' tinstab direttament jew indirettament (ara Anness 3). Normalment, ikun mehtieg minimu ta' hames postijiet fejn jittiehdu kampjuni waqt il-fażi tad-dizintegrazzjoni (jiġifieri wara li tintemm il-fażi tad-dewmien) sabiex tkun stmata r-rata kostanti affidabbli, sakemm ma jkunx ġustifikat li tliet postijiet tat-tehid ta' kampjuni huma biżżejjed għas-sustanzi li jiddizintegraw malajr. Għas-sustanzi li ma jiddizintegrawx malajr jista' jsir faċilment aktar kejl waqt il-fażi tad-dizintegrazzjoni u, għalhekk, għandhom jintużaw aktar postijiet tad-data biex tkun stmata k. L-ebda skeda tal-hin fissa għat-tehid ta' kampjuni ma tista' tkun stipulata, għaliex ir-rata ta' bijodegradabbiltà tvarja; madankollu hu rakkomandat li jittiehed kampjun darba f'gimgha jekk id-dizintegrazzjoni tkun baxxa. Jekk is-sustanza tat-test tiddizintegraw malajr, it-tehid ta' kampjuni għandu jsir darba kuljum fl-ewwel tlett ijiem u mbagħad kull tieni jew tielet ġurnata. Taht ċerti ċirkostanzi, bħal b'sustanzi li jkollhom azzjoni kimika mgħaġġla hafna fl-ilma, ikun mehtieg li jittiehdu kampjuni f'intervalli ta' siegħa. Hu rrikmandat li jsir studju preliminari qabel it-test sabiex ikunu magħrufa l-intervalli addattati tat-tehid ta' kampjuni. Jekk il-kampjuni jridu jkunu disponibbli għal aktar analiżi speċifika, ta' min jiehu aktar kampjuni u mbagħad jintgħazlu dawk li jridu jiġu analizzati fl-ahħar tal-esperiment wara li tintuża strategija b'lura, jiġifieri l-ahħar kampjuni jiġu analizzati l-ewwel (ara t-tieni paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5 għal gwida dwar l-istabbiltà tal-kampjuni waqt il-hzin).

▼ **M1**1.8.9.2. *Numru ta' fliexken u kampjuni*

Lesti numru biżżejjed ta' fliexken tat-test biex ikollok:

- fliexken tat-test; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (preferibbilment minimu ta' 3) jew diversi fliexken tat-test għal kull konċentrazzjoni, jekk fliexken tat-test shah jiġu pproċessati kull darba li jittiehdu l-kampjuni (simbolizzata F_T),
- fliexken tat-test għall-kalkolazzjoni tal-bilanċ tal-piż; tal-inqas fliexken doppji għal kull konċentrazzjoni tat-test (simbolizzata F_M),
- kontroll vojt, l-ebda sustanza tat-test; tal-inqas tal-flixkun tat-test vojt li fih biss l-ilma tat-test (simbolizzata F_B),
- kontroll ta' referenza; flixkien doppji bis-sustanza ta' referenza (eż. *aniline* jew *sodium benzoate* f'10 µg/l) (simbolizzata F_C). L-iskop tal-kontroll tar-referenza hu li jiġi kkonfermat minimu ta' attività tal-mikroorganizmi. Jekk hu konvenjenti, sustanza ta' referenza mmarkata bir-raġġi tista' tintuża, anki meta d-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test tiġi mmonitorjata permezz ta' analiżi kimika,
- kontroll li ma fihx mikroorganizmi; wiehed jew aktar mill-fliexken li fihom ilma tat-test minghajr mikroorganizmi biex tkun eżaminata d-diżintegrazzjoni mhux hajja li jista' jkun hemm jew xi tnehhija ohra li mhix bijoloġika tas-sustanza tat-test (simbolizzata F_S). L-attività bijoloġika tista' titwaqqaf permezz ta' sterilizzazzjoni bi pressjoni għolja taht stim (121 °C; 20 min) tal-ilma tat-test jew billi jiġi miżjud tossikant (eż. *sodium azide* (NaN_3) f'10-20 g/l, *chloride* tal-merkurju (HgCl_2) f'100 mg/l jew *formalin* f'100 mg/l jew billi tiġi esposta għar-raġġi gamma. Jekk jintuża HgCl_2 , għandhom jiddisponu minnu bhala skart tossiku. Għall-ilma miżjud bin-naqal f'ammont kbir, mhux faċli li jinkisbu l-kundizzjonijiet li ma jkunx fihom mikroorganizmi; f'dan il-każ hu irrikmandat li ssir aktar minn sterilizzazzjoni wahda bi pressjoni għolja tal-istim (eż. tliet darbiet). Ta' min iqis li l-karatteristiċi tas-*sorption* (naqal jistgħu jinbidlu meta ssir l-sterilizzazzjoni bi pressjoni għolja tal-istim,
- kontrolli tal-aġenti li jhollu, li fihom l-ilma tat-test u l-ilma tat-test bis-sustanza ta' referenza; fliexken doppji trattati bl-istess ammont ta' aġent li jinhall u bl-użu tal-istess proċedura bħal dik użata għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test. L-iskop hu li jiġu eżaminati xi effetti hżiena tal-aġent li jinhall billi tkun magħrufa d-diżintegrazzjoni tas-sustanza ta' referenza.

Fit-tfassil tat-test, l-investigatur għandu jqis l-importanza relattiva ta' żjieda fir-repetizzjoni tal-esperiment kontra żjieda fin-numru ta' hini-jiet tat-tehid tal-kampjuni. In-numru eżatt ta' fliexken mehtiega jiddependi mill-metodu użat biex titkejjel id-diżintegrazzjoni (ara t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1.; sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3).

▼ **M1**

Għandhom jittieħdu żewġ sotto kampjuni (eż. 5 ml kampjuni) minn kull flixxun tat-test kull meta jittieħdu l-kampjuni. Jekk jintużaw diversi fliexken biex ikunu jistgħu jiġu pproċessati fliexken shah, minimu ta' żewġ fliexken għandu jkun issagrifikat kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż [mhux obbligatorju]*

Żid il-volumi meħtieġa ta' ilma tat-test u n-naqal, jekk hemm bżonn, fil-kontenituri tat-test (ara sezzjoni 1.8.5). Il-preparazzjoni tal-fliexken għat-test tan-naqal sospiż huwa l-istess bħal dak għat-test li jsir fil-baħar miftuħ (ara s-sezzjonijiet 1.8.9.1 u 1.8.9.2). Jekk jista' jkun uża' fliexken tas-*serum* jew fliexken ta' għamla simili. Qiegħed il-fliexken magħluqa mimduda fuq dak li jregħedhom. Ovvjament, fliexken miftuħa għal sustanzi li ma jevaporawx ta' ^{14}C mhux mogħtija isem, għandhom jitqegħdu fil-pożizzjoni wieqfa, f'dan il-każ hu rrikkmandat li jsir thawwid manjetiku u l-użu ta' *bars* manjetiċi miksiya bil-ħġieġ. Jekk hemm bżonn, iċċarġja l-fliexken bil-gass biex iżzomm il-kundizzjonijiet xierqa li jkunu jeħtieġu l-ożsiġnu.

1.8.9.4. *Determinazzjonijiet radjokemikali*

Is- $^{14}\text{CO}_2$ evolut jitkejjel indirettament u direttament (ara Anness 3). Is- $^{14}\text{CO}_2$ jiġi magħruf indirettament permezz tad-differenza bejn l-attività ^{14}C inizjali fl-ilma tat-test jew is-sospensjoni u l-attività totali tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni meta jittieħdu l-kampjuni kif jitkejjel wara li l-kampjun ikun mimli bl-aċtu għal pH 2-3 u jitneħħa s- CO_2 . Il-karbonju inorganiku għalhekk jitneħħa u l-attività mkejjla tas-sustanza li jifdal wara l-evaporazzjoni tiġi minn materjal organiku. L-għarfien indirett tas- $^{14}\text{CO}_2$ m'għandux jintuża', jekk il-prodotti tat-trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiffurmaw waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test (ara Anness 3). Jekk jista' jkun, l-evoluzzjoni $^{14}\text{CO}_2$ għandha titkejjel direttament (ara Anness 3) kull meta jittieħdu l-kampjuni f'tal-inqas flixxun wiehed tat-test, din il-proċedura tagħti lok biex ikunu ċekkjati l-bilanċ tal-piż u l-proċess tal-bijodegradazzjoni, iżda hi ristretta għat-testijiet li jsiru fuq il-fliexken magħluqa.

Jekk is- $^{14}\text{CO}_2$ evolut jitkejjel direttament waqt it-test, aktar fliexken għandhom jiġu ppreparati għal dan il-ghan fil-bidu tat-test. Hu rrikkmandat li tkun magħrufa b'mod dirett is- $^{14}\text{CO}_2$, jekk prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri li jevaporaw malajr jiġu ffurmati waqt it-trasformazzjoni tas-sustanza tat-test. F'kull post ta' kejl il-fliexken tat-test l-oħra jimtlew bl-aċtu għal pH2-3 u s- $^{14}\text{CO}_2$ jingabar f'assorbitur intern jew estern (ara Anness 3).

Hemm ukoll l-għażla fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmiija ^{14}C u prodotti ta' trasformazzjoni maġġuri jistgħu jkunu magħrufa permezz tar-radjokromatografija (eż. kromatografija ta' saff irqiq, *RAD-TLC*) jew HPLC li taqbad ir-radjokimiċi.

Għażla oħra tista' tkun il-fażi tat-tqassim tar-radjoattività li fadal (ara Anness 1) u s-sustanza tat-test li jifdal wara l-evaporazzjoni u l-prodotti tat-trasformazzjoni jistgħu jiġu ddeterminati.

▼ M1

Fl-aħħar tat-test il-bilanċ tal-piż għandu jkun determinat permezz ta' kejl dirett tas- $^{14}\text{CO}_2$ bl-użu ta' flieken separati tat-test li minnhom ma jittiehdu l-ebda kampjuni waqt it-test (ara Anness 3).

1.8.9.5. *Analizi kimika speċifika*

Jekk ikun hemm metodu analitiku sensitiv speċifiku, il-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi evalwata billi titkejjel il-konċentrazzjoni totali li jkun fadal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test minflok l-użu ta' tekniki li jimmarkaw bir-raġġi. Jekk tintuża sustanza tat-test immarkata bir-raġġi (biex titkejjel il-mineralizzazzjoni totali), analizi kimiċi speċifiċi jistgħu jsiru fl-istess hin biex jagħtu informazzjoni oħra utli u biex jiċċekkjaw il-proċedura. Analizi kimika speċifika tista' tintuża wkoll biex jitkejjlu l-prodotti ta' trasformazzjoni ffurmati waqt id-dizintegrazzjoni tas-sustanza tat-test, u dan hu rrikmandat għas-sustanzi li huma mineralizzati b'nofs haġġiet li jeċċedu 60 gurnata. Il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni kull meta jittiehdu l-kampjuni għandhom jiġu mkejla u jsir rapport dwarhom (bħala konċentrazzjoni u bħala persentaġġ ta' dik applikata). Generalment, il-prodotti tat-trasformazzjoni li jinstabu $f \geq 10\%$ tal-konċentrazzjoni applikata fi kwalunkwe hin meta jittiehdu l-kampjuni għandhom ikunu identifikati sakemm ma jkunux hemm raġunijiet oħra ġustifikati biex isir mod ieħor. Il-prodotti ta' trasformazzjoni li għalihom dejjem qed jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet waqt l-istudju għandhom ukoll jitqiesu fl-identifikazzjoni, anki jekk il-konċentrazzjonijiet tagħhom ma jeċċedux il-limitu msemmi hawn fuq, għaliex dawn jistgħu jindikaw persistenza. L-analizi tal-prodotti ta' trasformazzjoni fil-kontrolli ta' sterilizzazzjoni għandha titqies, jekk trasformazzjoni mhux haġġa mghaġġla tas-sustanza tat-test (eż. idrolisi) tista' tiġi. Il-bżonn ta' kwantifikazzjoni u identifikazzjoni tal-prodotti tat-trasformazzjoni għandhom jitqiesu każ b'każ, u jingħataw ġustifikazzjonijiet għalihom fir-rapport. Tekniki biex jiġu estratti permezz tal-aġent organiku li jinħall għandhom ikunu applikati skont id-direzzjonijiet mogħtija fil-proċedura analitika rispettiva.

Il-kampjuni kollha għandhom jinħażnu f'temperatura ta' 2 sa 4 °C u jiġu ssiġġillati biex ma tidholx arja jekk l-analizi ssir fi żmien 24 siegħa (jekk hu possibbli). Għal hżin aktar fit-tul, il-kampjuni għandhom ikunu ffrizati taht temperatura ta' -18 °C jew ippriservati kimikament. L-użu ta' l-aċtu biex jiġu ppriservati l-kampjuni mhux metodu rrikmandat, għaliex il-kampjuni bl-aċtu jistgħu jkunu instabbli. Jekk il-kampjuni ma jiġux analizzati fi żmien 24 siegħa u mhumex soġġetti għall-hżin aktar fit-tul, għandu jsir studju dwar l-istabbiltà tal-hżin biex juru l-istabbiltà tal-kimiċi li hemm interess fihom taht temperatura tal-hżin ta' -18 °C jew kundizzjonijiet ippriservati. Jekk il-metodu analitiku jinvolvi jew li jiġi estratt l-aġent li jinħall jew il-fażi li jiġi estratt is-solidu (*SPE*), l-estrazzjoni għandha ssir mall-ewwel wara li jittiehdu l-kampjuni jew wara li jinħażen il-kampjun miżmum fil-frigġ għal massimu ta' 24 siegħa.

Skont is-sensittività tal-metodu analitiku, jista' jkun hemm bżonn volum ta' kampjuni akbar minn daww indikati fil-paragrafu 1.8.1. It-test jista' jsir faċilment bil-volumi tat-test ta' litru fi flieken b'volum ta' 2-3 litri, li bis-saħħa t'hekk ikunu jistgħu jingħabru kampjuni ta' madwar 100 ml.

▼ **M1****2. DATA U RAPPORTAR****2.1. KIF JĠĠU TRATTATI R-RIŻULTATI****2.1.1. Il-Plot tad-data**

Qarreb il-hinijiet tat-teħid ta' kampjuni għal numru shih ta' sigħat (sakemm is-sustanza ma tiddizintegrazzax hafna fi ftit minuti jew sigħat) iżda mhux għal numru shih ta' granet. Ipplottja l-estimi tal-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test (għas-sustanzi msem-mija ^{14}C) jew il-konċentrazzjoni li jkun fadal wara l-evaporazzjoni (għal sustanzi li mhux mogħtija isem), kontra l-hin kemm fi plot lineari kif ukoll semi-logaritmiku (ara Figuri 1a, 1b). Jekk saret id-dizintegrazzjoni, qabbel ir-riżultati mill-fliexken F_T ma' daww mill-fliexken F_S . Jekk il-medji tar-riżultati mill-fliexken bis-sustanza tat-test (F_T) u l-fliexken li ma fihomx mikro-organizmi (F_S) jvarjaw b'inqas minn 10 %, wieħed jista' jassumi li d-dizintegrazzjoni osserva-ta hi l-aktar waħda mhux hajja. Jekk id-dizintegrazzjoni fil-fliexken F_S hi ibaxx, il-figuri jistghu jintużaw biex isewwu daww miksuba bil-fliexken F_T (billi jitnaqqsu minnhom) sabiex ikun stmat il-livell ta' bijodegradazzjoni. Meta jsiru analiżi mhux obbliga-torji għall-prodotti maġġuri ta' trasformazzjoni, għandhom jingħataw plots tal-formazzjoni u l-waqgħa tagħhom flimkien ma' plot tal-waqgħa tas-sustanza tat-test.

Hu stima tat-tul tal-fażi tad-dewmien t_L mill-kurva tad-dizintegrazzjoni (plot semi-logaritmiku) billi tislet il-parti lineari tad-dizintegrazzjoni zero jew inkella billi tiddetermina l-hin għal madwar 10 % dizintegrazzjoni (ara Figuri 1a u 1b). Mill-plot semi-logaritmiku, hu stima tar-rata tal-ewwel ordni kostanti, k , u l-iżball standard tagħha permezz ta' rigress linear ta' $\ln$ (attività ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni jew il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test) kontra l-hin. Bil-kejl ^{14}C b' mod partikolari, uża biss data li tappartjeni għall-parti lineari tal-bidu tal-kurva wara li tkun intemmet il-fażi tad-dewmien, u aghli preferenza biex tagħzel ftit data u li tkun rappre-żentattiva aktar milli tagħzel numru akbar ta' data aktar incerta. L-incertezza hawnhekk tinkludi żbalji interni fl-użu dirett irrikmandat tal-attivitàjiet ^{14}C imkejla li jifdal wara l-evaporazzjoni (ara hawn taħt). Xi kultant ikun rilevanti li tikkalkula żewġ rati kostanti differ-enti, jekk id-dizintegrazzjoni ssegwi mudell f'żewġ fażijiet. Għal dan il-ghan huma mfissra żewġ fażijiet differenti tal-kurva tad-diz-in-tegrazzjoni. Il-kalkolazzjonijiet tar-rata kostanti k , u n-nofs hajja $t_{1/2} = \ln 2/k$, għandhom isiru għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment, meta jittieħdu sotto kampjuni mill-istess flixkun, jew billi jintużaw il-valuri medja, meta l-fliexken kollha huma ipproċessati kull meta jittieħdu l-kampjuni (ara l-aħhar para-grafu fis-sezzjoni 1.8.9.2). Meta tintuża l-proċedura msemmija l-ewwel, ir-rata kostanti u n-nofs hajja għandhom ikunu rrapportati għal kull wieħed mill-fliexken individwali repetuti tal-esperiment u bhala valur medju bl-iżball standard. Jekk intużaw konċentrazzjoni-jiet għolja tas-sustanza tat-test, il-kurva tad-dizintegrazzjoni tista' tiddevja sew minn linja dritta (plot semi-logaritmiku) u l-movimenti tal-ewwel ordni jistghu ma jkunux validi. Għalhekk ma jagħmilx sens li tiġi spjegata nofs hajja. Madankollu, għal firxa limitata ta' data, movimenti tal-ewwel ordni li jixxiebbu jistghu jiġu applikati u tkun stmata d-dizintegrazzjoni ta' nofs il-hin DT_{50} (hin biex tintlahaq 50 % dizintegrazzjoni). Madankolli, ta' min iżomm f' mohhu, li t-tul ta' hin tad-dizintegrazzjoni lil hinn mill-firxa ta' data magħżula ma jistax ikun previst bl-użu ta' DT_{50} li hu semplicement dak li jiddesk-rivi sett ta' data partikolari. Jezistu għodda analitiċi li jiffacilitaw il-kalkolazzjonijiet statistiċi u t-tpiġġja tal-kurva u l-użu ta' dan it-tip ta' *software* hu irrikmandat.

▼ M1

Jekk isiru analizi kimiċi speċifiċi, hu stima tar-rata tal-kostanti u tan-nofs hajjiet għad-diżintegrazzjoni primarja bħal t'hawn fuq għal mineralizzazzjoni totali. Jekk id-diżintegrazzjoni primarja hi l-proċess li jillimita jistgħu xi kultant jintużaw punti tad-data mill-proċess kollu tad-diżintegrazzjoni. Dan jiġri minhabba li l-kejl huwa dirett b'kuntrast mal-kejl tal-attività ^{14}C .

Jekk jintużaw sustanzi msemija ^{14}C , bilanċ tal-piż għandu jkun imfisser f'persentaġġ tal-konċentrazzjoni applikata tal-bidu, tal-inqas fl-aħhar tat-test.

2.1.2. Attività li jifdal wara l-evaporazzjoni

Meta l-parti msemija ^{14}C ta' sustanza organika tkun bijodegradata, il-parti l-kbira tal- ^{14}C tkun maqluba f' $^{14}\text{CO}_2$, filwaqt li parti oħra tintuża' għat-tkabbir tal-piż kollu tal-organizmi u/jew sintesi ta' sustanzi extra-ċellulari mehtieġa għall-metaboliżmu. Għalhekk, il-bijodegradazzjoni finali' kompluta ta' sustanza ma twassalx biex jiġi ikkonvertit 100 % tal-karbonju tagħha f' $^{14}\text{CO}_2$. Il- ^{14}C li hemm fil-prodotti fformati bil-bijosintesi hi sussegwentement merhija bil-mod bħala $^{14}\text{CO}_2$ minhabba "l-mineralizzazzjoni sekondarja". Għal dawn ir-raġunijiet il-plots tal-attività organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni (mkejla wara li jitneħħa s- CO_2) jew tas- $^{14}\text{CO}_2$ prodott kontra l-hin juru "parti inferjuri" wara li tkun tlestiet id-diżintegrazzjoni. Dan jikkumplikja l-interpretazzjoni kinetika tad-data u għal dan il-għan, il-parti inizjali tal-kurva biss (wara li tkun intemmet il-fażi tad-dewmien u qabel ma tkun intlaħqet madwar 50 % diżintegrazzjoni) għandha tintuża' normalment biex tkun stmata r-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni. Jekk is-sustanza tat-test tiġi diżintegrata, l-attività totali organika ^{14}C li jifdal wara l-evaporazzjoni hi dejjem oghla mill-attività ^{14}C assoċjata mas-sustanza tat-test intatta li jifdal. Jekk is-sustanza tat-test hi diżintegrata bir-reazzjoni ta' l-ewwel ordni u frazzjoni kostanti α hi mibdula fil-minerali CO_2 , in-niżla inizjali tal- ^{14}C kurva li tisparixxi (organika totali ^{14}C kontra l-hin) se tkun α immultiplikata bin-niżla tal-kurva korrispondenti għall-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test (jew, biex inkunu preċiżi, il-parti tas-sustanza tat-test mogħtija l-isem ^{14}C). Bl-użu tal-kejl tal-attività totali organika ^{14}C mhux ikkoreġuta, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni ikkalkulata se tkun għalhekk konservattiva. Proċeduri biex ikunu stmati l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test mill-attivitàjiet radjokimiċi mkejla bbażati fuq diversi ipotesi ta' simplifikazzjoni ġew deskritti fil-letteratura (2)(9)(10)(11). Dawk il-proċeduri huma faċilment applikabbli għal sustanzi li jiddiżintegraw malajr.

2.2. INTERPRETAZZJONI TAR-RIŻULTATI

Jekk jinstab li k hi indipendenti mill-konċentrazzjoni miżjuda (jiġifieri jekk il-k ikkalkulata hi kwazi l-istess f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza tat-test), wiehed jista' jassumi li r-rata kostanti ta' l-ewwel ordni hi rappreżentattiva tal-kundizzjonijiet ta' l-ittestjar użati, jiġifieri s-sustanza tat-test, il-kampjun ta' l-ilma, u t-temperatura tat-test. Sa fejn jistgħu jiġu ġeneralizzati r-riżultati jew estiżi għal sistemi oħra jrid ikun evalwat billi jiġġudikahom esperti. Jekk tintuża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test, u għalhekk id-diżintegrazzjoni ma ssegwix il-movimenti tal-ewwel ordni, id-data ma tistax tintuża' għal stima diretta tar-rata kostanti tal-ewwel ordni jew innofs hajja korrispondenti. Madankollu, data mehuda minn test li juża' konċentrazzjoni għolja tas-sustanza tat-test tista' xorta tibqa' tajba biex ikun stmat l-ammont ta' mineralizzazzjoni totali u/jew biex ikunu misjuba u kwantifikati l-prodotti ta' trasformazzjoni.

▼ M1

Jekk ikunu magħrufa r-rati ta' proċessi oħra ta' telf barra l-bijodegradazzjoni (eż l-idrolizi jew l-evaporazzjoni mgħaġġla), huma jistgħu jitnaqqsu mir-rata ta' telf netta osservata waqt it-test biex tingħata stima approssimattiva tar-rata tal-bijodegradazzjoni. Id-data għall-idrolizi tista', eż, tinkiseb mill-kontroll li ma fiha mikro-organizmi jew mill-ittestjar fl-istess hin billi tintuża' konċentrazzjoni oġġla tas-sustanza tat-test.

L-għarfien indirett u dirett tas- ^{14}C (sezzjoni 1.8.9.4 u Anness 3) jista' jintuża biss biex ikejjel sa fejn saret il-mineralizzazzjoni tas-sustanza tat-test f' CO_2 Ir-radjokromatografija (RAD-TLC) jew il-HPLC jistgħu jintużaw biex janalizzaw il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test imsemmija ^{14}C u l-iffurmar ta' prodotti tat-trasformazzjoni magħġuri (t-tielet paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.4). Biex tkun tista' ssir stima diretta tan-nofs haġġa, jehtieg li ma jkun hemm l-ebda prodotti tat-trasformazzjoni magħġuri (mfissra bhala $\geq 10\%$ tal-ammont applikat tas-sustanza tat-test). Jekk ikun hemm prodotti tat-trasformazzjoni magħġuri kif imfissra hawnhekk, jehtieg li jkun hemm evalwazzjoni dettaljata tad-data Din tista' tinkludi testjar imtenni u/jew identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5) sakemm id-destin tal-prodotti ta' trasformazzjoni ma jistax ikun evalwat sew mill-esperjenza (eż. informazzjoni dwar ir-rotot tad-diżintegrazzjoni). Peress li l-proporzjon tal-karbonju tas-sustanza tat-test mibdul f' CO_2 ivarja (l-aktar skont il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test u sottostrati oħra li jkun hemm, il-kundizzjonijiet tat-test u l-komunità tal-mikroorganizmi), dan it-test ma jagħtix lok biex issir stima faċli tal-bijodegradazzjoni finali bħal f'test dgħajef DOC; iżda r-risultat huwa simili għal dak miksub permezz ta' test respirometrik. L-ammont ta' mineralizzazzjoni għalhekk ikun inqas minn jew ugwali għal-livell minimu ta' bijodegradazzjoni finali. Biex tinkiseb stampa aktar shiha tal-bijodegradazzjoni finali (l-mineralizzazzjoni u l-inkorporazzjoni fil-piż ta' l-organizmi), l-analiżi tal-fażi tat-tqassim ta' ^{14}C għandha ssir fl-aħħar tat-test (ara l-Anness 1). Il- ^{14}C fl-għadira tal-partikuli separati se tkun magħmula minn ^{14}C inkorporati fil-piż tal-mikroorganizmi batteriċi u ^{14}C iffurmati b'lura f'partikuli organiċi.

2.3. VALIDITÀ TAT-TEST

Jekk is-sustanza ta' referenza mhix diżintegrata fl-intervall tal-hin mistenni (għal *aniline* u *sodium benzoate*, normalment inqas minn ġimagħtejn), il-validità tat-test tkun suspettata u trid tkun ivverifikata aktar, jew inkella t-test għandu jiġi mtenni b'kampjun ġdid tal-ilma. F'*ring* test ISO tal-metodu fejn seba' laboratorji li jinsabu madwar l-Ewropa ipparteċipaw, il-kostanti tar-rata tad-diżintegrazzjoni addattati għall-*aniline* varjaw minn 0,3 għal 1,7 ġurnata⁻¹ b'medja ta' 0,8 d⁻¹ f' 20 °C u żball standard ta' $\pm 0,4 \text{ d}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,9$ ġranet). Hinijiet tipiċi tad-dewmien kienu 1 sa 7 ijiem. L-ilmijiet eżaminati ġew irrappurtati li kellhom piż totali tal-mikroorganizmi batteriċi li jikkorrispondu għal 10^3 - 10^4 units li jiffurmaw kolonja (CFL) kull ml. Ir-rati tad-diżintegrazzjoni fl-ilmijiet Ewropej tan-Nofs li huma rikki fin-nutrienti kienu akbar minn dawk fl-ilmijiet Nordici li huma relattivament neqsin min-nutrienti tal-pjanti, li jista' jkun dovut għall-istat differenti tan-nutrizzjoni jew qabel kienu esposti għal sustanzi kimiċi.

L-irkuprar totali (bilanċ tal-piż) fl-aħħar ta' l-esperiment għandu jkun bejn 90 % u 110 % għas-sustanzi immarkati bir-raġġi, filwaqt li l-irkuprar inizjali fil-bidu ta' l-esperiment għandu jkun bejn 70 % u 110 % għas-sustanzi li mhumiex imsemmija. Madankollu, il-firxiet indikati għandhom ikunu interpretati biss bhala miri u m'għandhomx jintużaw bhala kriterji biex jiġi aċċettat it-test.

▼ **M1**

3.

RAPPORT TAT-TEST

It-tip ta' studju, jiġifieri t-test f'baħar miftuħ jew it-test tan-naqal li jkun miżmum xi mkien bejn il-qiegh u l-wiċċ, għandu jkun dikjarat sew fir-rapport tat-test, li għandu jkun fih ukoll ta' l-inqas l-informazzjoni li ġejja:

Is-sustanza tat-test u s-sustanza(i) ta' referenza:

- ismijiet komuni, ismijiet kimiċi (irrikmanda *IUPAC* u/jew ismijiet *CAS*), numri *CAS*, *formulas* strutturali (li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża' sustanza mmarkata bir-raġġi) u karatteristiċi rilevanti fiżiko-kimiċi tat-test u s-sustanza ta' referenza (ara sezzjonijiet 1.5 u 1.6),
- ismijiet kimiċi, numri *CAS*, *formulas* strutturali (li jindikaw il-pożizzjoni ta' ^{14}C jekk tintuża' sustanza immarkata bir-raġġi) u karatteristiċi fiżiko-kimiċi tas-sustanzi użati bħala standards għall-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni,
- il-purità (l-impurità) tas-sustanzi tat-test u ta' referenza,
- il-purità radjokimika tal-attività kimika msemija u speċifika (fejn jixraq).

Ilma tal-wiċċ:

L-informazzjoni minima li ġejja għall-kampjun tal-ilma meħud għandha tingħata:

- post u deskrizzjoni tas-sit fejn ittiehdu l-kampjuni inkluż, jekk jista' jkun, l-istorja tal-kontaminazzjoni,
- id-data u l-hin tal-ġbir tal-kampjuni,
- in-nutrienti (N totali, l-ammonju, in-nitrite, in-nitrate, P totali, *orthophosphate* mahlul fl-ilma),
- il-fond tal-ġbir,
- id-dehra tal-kampjun (eż. il-kulur u kemm hu mdardar),
- id-DOC u t-TOC,
- il-BOD,
- it-temperatura u l-pH fl-istess post u hin tal-ġbir,
- l-ossigenu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jehtieġu l-ossigenu mhumx ovvjji),
- kemm fih melh jew kemm jgħaddi minnu (fil-każ tal-ilma baħar u ilma f'it melaħ),
- solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegh u l-wiċċ (fil-każ ta' kampjun mdardar),
- jekk jista' jkun xi informazzjoni oħra rilevanti dwar il-post fejn ittiehdu l-kampjuni fil-hin meta ttiehdu (eż. data vera jew storika dwar ir-rata tat-tgelgil tax-xmajjar jew il-kurrenti tal-baħar, postijiet maġġuri li jbatlu 'l barra li huma viċin il-post u t-tip ta' tbatil, il-kundizzjonijiet tat-temp qabel il-hin li fih ittiehdu l-kampjuni,

u l-informazzjoni mhux obligatorja li ġejja:

- il-piż totali tal-mikroorganizmi (eż. l-għadd dirett ta' *l-acridine orange* jew il-units li jiffurmaw kolonji),

▼ **M1**

- karbonju inorganiku,
- konċentrazzjoni ta' *chlorophyll-a* bħala stima speċifika għall-piż totali tal-mikroorganizmi ta' l-alka.

Barra minn hekk, l-informazzjoni li ġejja dwar in-naqal għandha tinghata jekk isir it-test dwar in-naqal miżmum xi mkien bejn il-qiegh u l-wiċċ:

- kemm hu fil-fond in-naqal miġbur,
- id-dehra tan-naqal (bhal ikkulurita, imtajna, imnaqqla, jew imramla),
- il-konsistenza (eż. ramel ahrax, ramel fin, naqal u tafal),
- użin xott f'g/l tas-solidi miżmuma x'imkien bejn il-qiegh u l-wiċċ, il-konċentrazzjoni *TOC* jew it-telf fil-piż meta jinxtegħel bħala kejl tal-kontenut ta' materja organika,
- il-*pH*,
- l-ossigenu jew il-potenzjal tal-ossidazzjoni u t-tnaqqis (obbligatorju biss jekk il-kundizzjonijiet fejn jehtieg l-ossigenu mhumiex ovvjji).

Kundizzjonijiet tat-test:

- dewmien bejn il-ġbir u l-użu fit-test tal-laboratorju, il-ħżin tal-kampjun u t-trattament minn qabel tal-kampjun, id-data ta' kif marru l-istudji,
- l-ammont ta' sustanza tat-test applikat, il-konċentrazzjoni tat-test u s-sustanza ta' referenza,
- il-metodu tal-applikazzjoni tas-sustanza tat-test inkluż kull użu ta' aġenti li jinhallu fl-ilma,
- il-volum tal-ilma tal-wiċċ użat u n-naqal (jekk intuża) u l-volum użat għall-kampjuni f'kull intervall għall-analiżi,
- deskrizzjoni tas-sistema tat-test użata,

jekk m'għandhomx jinżammu kundizzjonijiet mudlama, informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet b' "dawl batut",

- informazzjoni dwar il-metodu(i) użat(i) biex ikunu stabbiliti l-kontrolli li ma fihomx mikroorganizmi (eż. it-temperatura, il-ħin u n-numru ta' sterilizzazzjonijiet bi stim ta' pressjoni għolja),
- it-temperatura tal-inkubazzjoni,
- informazzjoni dwar tekniki analitiċi u l-metodu(i) użati għal kejl radjokemikali u għall-bilanċ tal-piż u l-kejl tal-fażi tat-tqassim (jekk sar),
- numru ta' repetizzjonijiet tal-esperiment.

Riżultati:

- persentaġġi ta' rkuprar (ara sezzjoni 1.7.1),
- kemm għandhom jiġu mtennija u kemm huma sensittivi l-metodi analitiċi użati inkluż il-limitu ta' sejbien (*LOD*) u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (*LOQ*) (ara sezzjoni 1.7.2),

▼ **M1**

- id-data kollha mkejla (inkluz il-punti tal-hin tat-tehid tal-kamp-juni) u l-valuri kkalkulati f'forma ta' tabelli u l-kurvi tad-diżintegrazzjoni; għal kull konċentrazzjoni tat-test u għal kull flixkun irrepertut għall-esperiment, irrapporta l-ko-effiċjent tal-korrelazzjoni lineari għan-niżla tal-plot logaritmiku, il-fażi tad-dewmien stmata u r-rata kostanti tal-ewwel ordni jew li tixxiebah (jekk jista' jkun), u d-diżintegrazzjoni nofs haġja korrispondenti (jew il-perjodu nofs haġja, t_{50}),
- irrapporta l-valuri rilevanti bħala medji tar-riżultati osservati fir-repetizzjonijiet individwali tal-esperimenti, eż. it-tul tal-fażi tad-dewmien, ir-rata kostanti tad-diżintegrazzjoni u d-diżintegrazzjoni nofs haġja (jew t_{50}),
- qiegħed f'kategoriji s-sistema jew bħala mhux addattata jew addattata kif għidkati mid-dehra tal-kurva tad-diżintegrazzjoni u mill-influenza li jista' jkun hemm tal-konċentrazzjoni tat-test,
- ir-riżultati tal-verifika tal-bilanċ tal-piż finali u r-riżultati fuq il-kejl tal-fażi tat-tqassim (jekk hemm),
- il-frazzjoni ta' ^{14}C mineralizzat u, jekk jintużaw analiżi speċifiċi, il-livell finali tad-diżintegrazzjoni primarja,
- l-identifikazzjoni, il-konċentrazzjoni tal-konċentrazzjoni *molar* u l-persentaġġ tal-prodotti applikati u maġġuri ta' trasformazzjoni (ara l-ewwel paragrafu fis-sezzjoni 1.8.9.5), fejn jixraq,
- mogħdija proposta tat-trasformazzjoni, fejn jixraq,
- diskussjoni tar-riżultati.

4. **LETTERATURA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test
2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Il-kwalità tal-ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegrabbiltà li teħtieġ l-ossigenu tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi — Parti 1: Hawwad il-flixkun tat-test tal-grupp li fih ilma tal-wieċ jew ilma tal-wieċ/naqal miżmuma x'imkien bejn il-qieġ u l-wieċ.
3. Metodu tat-Testjar C. 23. Trasformazzjoni tal-organizmi li jeħtieġu l-ossigenu fl-ilma u li ma jeħtieġux ossigenu fil-hamrija.
4. Metodu tat-Testjar C.24. Trasformazzjoni tal-organizmi li jeħtieġu l-ossigenu u li ma jeħtieġux l-ossigenu biex jikbru fin-naqal akwatiku.
5. OECD (1993). Linji ta' gwida biex ikunu Ittestjati l-Kimiċi. OECD, Pariġi.
6. ISO 8245 (1999). Kwalità tal-ilma — Linji ta' gwida dwar l-għarfien tal-karbonju organiku totali (TOC) u karbonju organiku mahlul fl-ilma (DOC).
7. ISO 10634 (1995). Il-kwalità tal-ilma — Gwida biex jiġu ippreparati u trattati *compounds* organiċi li ma jinhallux malajr fl-ilma għal evalwazzjoni sussegwenti tal-bijodegradabbiltà tagħhom f'mezz li fih l-ilma.
8. Abbozz tal-OECD (2000). Dokument ta' Gwida dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u tahlitiet diffiċli. Pubblikazzjonijiet dwar is-Saħħa u s-Sigurtà Ambjentali. Sensiela fuq l-Ittestjar u l-Evalwazzjoni. Nru 22 (biex ikun ippubblikat fis-sajf 2000).

▼ M1

9. Simkins, S. u Alexander, M. (1984). Mudelli għall-movimenti tal-mineralizzazzjoni bil-varjabbli tal-konċentrazzjoni tas-sottos-trata u d-densità tal-popolazzjoni Mikrobijologija Ambjentali Applikata 47, 394-401.
10. Ingerslev, F. u N. Nyholm. (2000). Test dwar it-tħawwid ta' flixxun biex ikunu magħrufa r-rati tal-bijodegradazzjoni tal-kimiċi msejha ^{14}C b'konċentrazzjonijiet baxxi fis-sistemi ta' l-ilma tal-wiċċ. Sigurtà Ambjentali Ekotossika 45, 274-283.
11. ISO/CD 14592-1 (1999). Rapport tat-test tar-ring: Kwalità tal-ilma — Evalwazzjoni tal-bijodegradabbiltà tal-organizmi li jehtieġu l-ossigenu fil-wiċċ tal-ilma tal-*compounds* organiċi b'konċentrazzjonijiet baxxi parti 1 — rapport tat-test tar-ring 1998/1999. Hawwad il-flixxun tal-grupp tat-test li fih l-ilma tal-wiċċ jew l-ilma tal-wiċċ/naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ.

▼ **M1***Anness 1***Fażi tat-tqassim tal-¹⁴C**

Sabiex tiċċekkja l-proċedura, il-kejl tas-soltu tal-attività ¹⁴C organika totali li jifdal wara l-evaporazzjoni (*TOA*) għandha tkun miżjuda bil-kejl tal-bilanċ tal-piż li jinvolvi għarfien dirett tal-¹⁴C₂ evoluta wara li tinqabad f'assorbitur (ara Anness 3). Fiha nnifsha, formazzjoni pożittiva ¹⁴CO₂ hi evidenza diretta tal-bijodegradazzjoni kuntrarjament għad-dizintegrazzjoni mhux ħajja, jew mekkanizmi oħra ta' telf, bħall-evaporazzjoni mgħaġġla u *s-sorption*. Informazzjoni oħra utli li tikkarakterizza l-imġiba tal-bijodegradabbiltà tista' tinkiseb mill-kejl tat-tqassim tat-*TOA* bejn l-istat mahlul fl-ilma (attività organika ¹⁴C mahlula fl-ilma, *DOA*) u l-istat tal-partikuli separati (attività organika ¹⁴C tal-partikuli separati, *POA*) wara l-firda tal-partikuli separati permezz ta' filtrar tal-membrana jew ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga. Il-*POA* hu magħmul mis-sustanza tat-test *sorbed* fuq il-piż totali tal-mikroorganizmi u fuq partikuli oħra barra mill-karbonju tas-sustanza tat-test li ntuzaw għas-sinteżi tal-materjal ġdid ċellulari u riżultat t'hekk inkorporati fil-frazzjoni tal-piż totali tal-partikuli separati tal-mikroorganizmi. L-iffurmar ta' materjal organiku ¹⁴C mahlul fl-ilma jista' jkun stmat bħala *DOA* fl-aħħar tal-bijodegradazzjoni (art għolja fuq id-dizintegrazzjoni kontra l-kurva tal-hin).

Hu stima tal-fażi tat-tqassim ta' ¹⁴C li jifdal wara l-evaporazzjoni f'kampjuni magħżula bl-iffiltrar tal-kampjuni fuq 0,22 µm jew 0,45 µm jew filter tal-membrana ta' materjal li ma jzommx fil-wiċċ ammonti sinifikanti tas-sustanza tat-test (filters *polycarbonate* jistghu jkunu addattati). Jekk *is-sorption* tas-sustanza tat-test fuq il-filter hi kbira wisq biex tkun injorata (biex tiġi iċċekjata qabel l-esperiment) jista' jintuza' proċess b'magna ta' ċentrifuga (2 000 g, 10 min) minflok l-iffiltrar.

Ipproċedi bil-likwidu ffiltrat jew is-solidu mifrud mil-likwidu kif deskritt fl-Anness 3 għal kampjuni mhux iffiltrati. Holl il-filters tal-membrana fi fluwidu florexenti addattat u għodd bħas-soltu, normalment billi tuza' biss il-metodu tal-proporzjon tal-istandards esterni biex titnaqqas l-illuminazzjoni, jew uża kampjun li jithallat ma' l-ossigenu. Jekk intuża l-proċess b'magna ta' ċentrifuga, erġa' ssospendi l-ballun żgħir iffurmat minn frazzjoni ta' partikuli separati f'1-2 ml ta' ilma distillat u ttrasferixxih għal kontenitur żgħir tal-medicini li hu florexenti. Ahsel sussegwentement darbtejn b'1ml ilma distillat u ittrasferixxi l-ilma tal-ħasil għall-kontenitur żgħir tal-medicini. Jekk hemm bżonn, is-sospensjoni tista' ssir f'ġel li jghodd il-florexenza tal-likwidu.

▼ M1

Anness 2

proċedura semi-kontinwa

Tista' tkun meħtieġa l-inkubazzjoni fit-tul għal diversi xhur sabiex tintlaħaq diżintegrazzjoni suffiċjenti tas-sustanzi li ma jobdux. It-tul tat-test m'għandux jaqbeż normalment is-60 ġurnata sakemm il-karatteristiċi tal-kampjun tal-ilma oriġinali ma jinżammux permezz ta' tiġdid tat-test ta' sospensjoni. Madankollu, il-perjodu tat-test jista' jkun estiż għal massimu ta' 90 jum mingħajr tiġdid tas-sospensjoni tat-test, jekk id-diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test bdiet fl-ewwel 60 ġurnata.

Waq t-inkubazzjoni għal perjodi twal, id-diversità tal-komunità tal-mikroorganizmi tista' titnaqqas minhabba mekkaniżmi diversi ta' telf u minhabba l-qerda possibbli tal-kampjun tal-ilma ta' nutrijenti essenzjali u sottostrati primarji tal-karbonju. Hu għalhekk irrikmandat li jintuza test semi-kontinwu biex tkun determinata biżżejjed ir-rata ta' diżintegrazzjoni tas-sustanzi li jiddiżintegraw bil-mod. It-test għandu jinbeda permezz ta' proċedura semi-kontinwa jekk, skont esperjenza mgħoddija, hu mistenni li jkun meħtieġ perjodu ta' inkubazzjoni ta' tliet xhur biex tinkiseb 20 % diżintegrazzjoni tas-sustanza. Inkella, it-test normali tal-grupp jista' jinbidel f'wieħed semi-kontinwu, jekk ma tkunx inkisbet diżintegrazzjoni tas-sustanza tat-test waqt madwar 60 ġurnata ta' testjar bl-użu tal-proċedura tal-grupp. Il-proċedura semi-kontinwa tista' titwaqqaf u t-test jitkompla bħala esperiment tal-grupp, meta tkun giet irrekordjata diżintegrazzjoni sostanzjali (eż. > 20 %).

Fit-test semi-kontinwu, kull ġimagħtejn, madwar terz tal-volum tat-test tas-sospensjoni jiġi mibdul b'ilma frisk miġbur bis-sustanza tat-test miżjuda mal-konċentrazzjoni tal-bidu. In-naqal jiġi miżjud bl-istess mod ma' l-ilma mibdul mal-konċentrazzjoni tal-bidu (bejn 0,01 u 1 g/l), jekk isir it-test sospiż tan-naqal mhux obligatorju. Meta jsir it-test mas-solidi tan-naqal miżmuma x'imkien bejn il-qiegħ u l-wiċċ, hu importanti li s-sistema sospiża kollha tinzamm anki waqt li jitneħħa l-ilma, u l-hin residenti jkun identiku għas-solidi u l-ilma, għax inkella x-xebh mahsub ma' sistema uniformi akwatika bl-ebda fażijiet fissi tista' tintilef. Għal dawn ir-raġunijiet, konċentrazzjoni inizjali tan-naqal miżmum bejn il-qiegħ u l-wiċċ fil-medda t'isfel tal-intervall speċifikat hi preferuta, meta tintuza l-proċedura semi-kontinwa.

Iż-zieda preskritta tas-sustanza tat-test tfisser li l-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza tat-test ma tiġix maqbuża bit-tiġdid parzjali tat-test ta' sospensjoni u, għalhekk, l-addattament, li hu ta' spiss meqjus b'konċentrazzjonijiet għolja tas-sustanza tat-test, ikun evitat. Peress li l-proċedura tikkonsisti minn dħul mill-ġdid tal-organizmi u kumpens tan-nutrijenti meqruda u s-sottostrati primarji, id-diversità oriġinali tal-mikroorganizmi terġa' tingab għal li kienet, u t-tul tat-test jista' jkun estiż għal dejjem fil-prinċipju. Meta tintuza l-istess proċedura semi-kontinwa, hu importanti li wieħed jinnota l-konċentrazzjoni li jifdal wara l-evaporazzjoni tas-sustanza tat-test għandha tiġi korretta għall-ammonti tas-sustanza tat-test miżjuda u mneħħija f'kull proċedura ta' tiġdid. It-total u l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test mahlula fl-ilma tista' tintuza b'mod alternat għall-*compounds* li jiffurmaw lura ftit. Il-formazzjoni lura hi insinifikanti (< 5 %) taħt il-kundizzjonijiet speċifikati (0,1-1g solidi/l) għas-sustanzi ta' *log Kow* < 3 (validi għall-*compounds* newtrali *lipophilic*). Dan jidher permezz tal-eżempju ta' kalkolazzjoni li ġej. 0,1 g/l ta' solidi bejn wieħed u iehor jikkorrispondu għal 10 mg ta' karbonju kull litru (frazzjoni ta' karbonju, $f_C = 0.01$). Billi nassumu li;

$$\text{Log } K_{ow} (\text{tas-sustanza tat-test}) = 3$$

$$K_{oc} = 0.42 \times K_{ow}$$

$$\text{Koeffiċjent ta' partizzjoni, } K_d = f_C \times K_{oc}$$

imbagħad, il-frazzjoni mahlula fl-ilma tal-konċentrazzjoni totali (C-ilma (C_w)/C-totali (C_t) hija:

$$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1/(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999$$

▼ M1

Anness 3

Kif jiġi determinat il- $^{14}\text{CO}_2$ Għarfien indirett tal- $^{14}\text{CO}_2$

Għall-kejl tas-soltu, il-metodu indirett huwa normalment l-inqas wieħed li jiehu hin u l-aktar metodu preċiż jekk is-sustanza tat-test ma tevaporax malajr u ma tkunx trasformata f'prodotti tat-trasformazzjoni li jevaporaw malajr. Trasferiment semplici tal-kampjuni mhux iffiltrati eż. daqs ta' 5 ml f'kontenituri żgħar florex-xenti użati għall-mediċina. Attività addattata fil-kampjuni hija 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq) fil-bidu, u attività minima inizjali hi madwar 1 000 dpm. Is- CO_2 għandu jitneħħa wara li jinkesa bl-aċtu għal pH 2-3 b'1-2 qatriet ta' H_3PO_4 ikkonċentrat jew HCl . It-tneħħija tas- CO_2 tista' ssir billi jiddaħhlu b'żieqaq tal-arja għal nofs siegħa — siegħa. Inkella, il-kontenituri ż-żgħar użati għall-mediċina jistgħu jiġu mħawda bis-saħħa għal siegħa — sagħtejn (per eżempju fuq *microplate shaker*) jew b'thawwid aktar gentili li jithalla bil-lejl. L-effiċjenza tal-proċedura tat-tneħħija tas- CO_2 għandha tkun iċċekkjata (billi jittawwal il-perjodu ta' l-iċċarġjar bil-gass jew tat-thawwid). Likwidu florex-xenti, addattat biex jiġu magħduda l-kampjuni akwatiċi għandu mbagħad jiġi miżjud, il-kampjuni uniformi fuq mikser li jdur u r-radjoattività magħrufa permezz tal-ghadd tal-likwidu florex-xenti, titnaqqas l-attività tal-isfond misjub fit-testijiet vojta (F_B). Sakemm l-ilma tat-test ma jkunx ikkulurit hafna jew ikun fih konċentrazzjoni għolja tal-partikuli, il-kampjuni normalment juru florex-xenza uniformi u se jkun biżżejjed biex jitnaqqsu l-korrezzjonijiet bl-użu ta' standard estern. Jekk l-ilma tat-test hu ikkulurit hafna, jista' jkun hemm b'żonn li titnaqqas il-korrezzjoni permezz ta' żjieda ta' standard intern. Jekk il-konċentrazzjoni tal-partikuli hi għolja jista' ma jkunx possibbli biex tinkiseb tahlita jew ġel uniformi, jew il-varjazzjoni fit-tnaqqis bejn il-kampjuni tista' tkun kbira. F'dak il-każ il-metodu tal-ghadd deskritt hawn taht għat-test tat-tahlitiet ta' semi-likwidi jista' jintuża. Jekk it-test isir bhala test tan-naqal miżmum x'imkien bejn il-qiegh u l-wiċċ, il-kejl tal- $^{14}\text{CO}_2$ jista' jsir indirettament billi jittiehed kampjun uniformi ta' 10 ml tal-ilma tat-test/sospensjoni tat-test u jinfirdu l-fażijiet permezz ta' proċess b'magna ta' ċentrifuga b'veloċità addattata (eż. b'40 000 m/s² għal 15-il min.) Il-fażi akwatika għandha mbagħad tkun trattata kif deskritt hawn fuq. L-attività ^{14}C fil-fażi tal-partikuli separati (*POA*) għandha tkun determinata billi n-naqal jerġa' jiġi miżmum x'imkien bejn il-qiegh u l-wiċċ f'volum żgħir ta' ilma distillat, billi jiġi trasferit f'kontenituri żgħar florex-xenti użati għall-mediċina, u billi jizdied il-likwidu florex-xenti halli jifforma ġel (jeżistu likwidi speċjali florex-xenti għal dan il-ghan). Skont in-natura tal-partikuli (eż. kemm fihom materjal organiku), jista' jkun jaqbel li l-kampjun jiġi diġerit bil-lejl b'*solubiliser* tat-tissue u mbagħad jiġi uniformi fuq mikser li jdur qabel ma jizdied il-likwidu florex-xenti. Inkella, il-*POA* tista' tinstab permezz ta' kombustjoni mill-oġġnu bl-użu ta' dak li jhallat ma' l-oġġnu l-kampjun. Meta tkun qed tgħodd, l-istandards interni għandhom dejjem ikunu inkluzi, u jista' jkun hemm b'żonn li jsiru t-tiswijiet tat-tnaqqis billi jizdied standard intern għal kull kampjun individwali.

Għarfien dirett tal- $^{14}\text{CO}_2$

Jekk il- $^{14}\text{CO}_2$ evoluta titkejjel direttament, għandha ssir billi jiġu preparati aktar fliexken fil-bidu tat-test, jiġu pproċessati l-fliexken tat-test f'kull punt tal-kejl billi l-fliexken tat-test jintlew bl-aċtu għal pH 2-3 u jingabar il- $^{14}\text{CO}_2$ f'assorbitur intern (imqiegħed f'kull fliexkun fil-bidu tat-test) jew estern. Bhala mezz li jassorbi jista' jintuża jew *l-alkali* (eż. tahlita 1 N NaOH , jew NaOH pellet), *ethanolamine* jew ibbażata fuq *l-ethanolamine*. Għall-kejl dirett tal- $^{14}\text{CO}_2$, il-fliexken għandhom ikunu magħluqa per eżempju bl-gheluq tal-lastku sintetiku.

▼ M1

Figura 1a

Eżempju ta' plot aritmetiku tad-data (l-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-hin

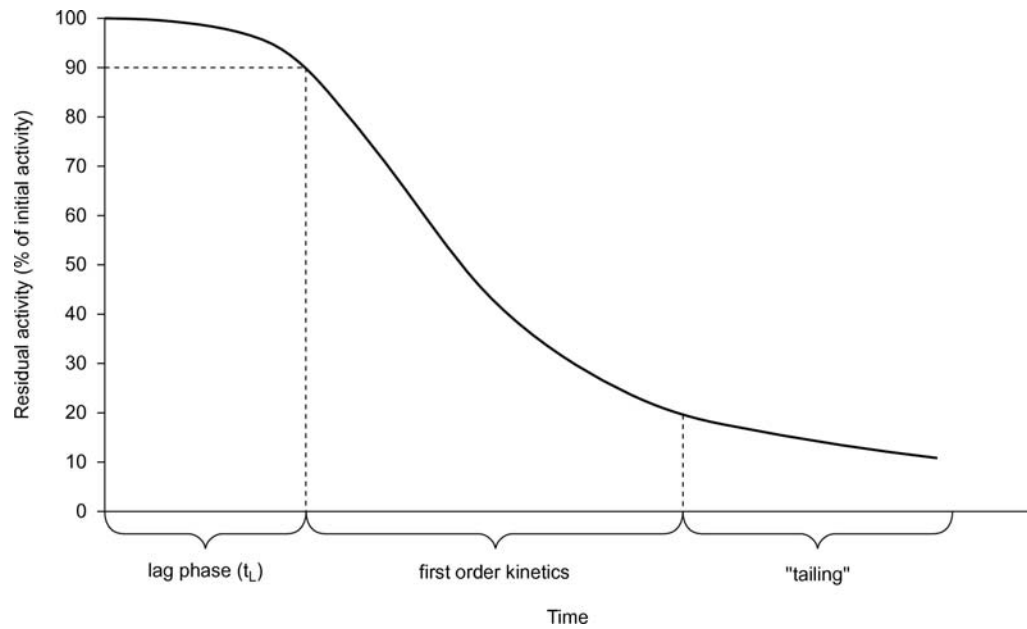
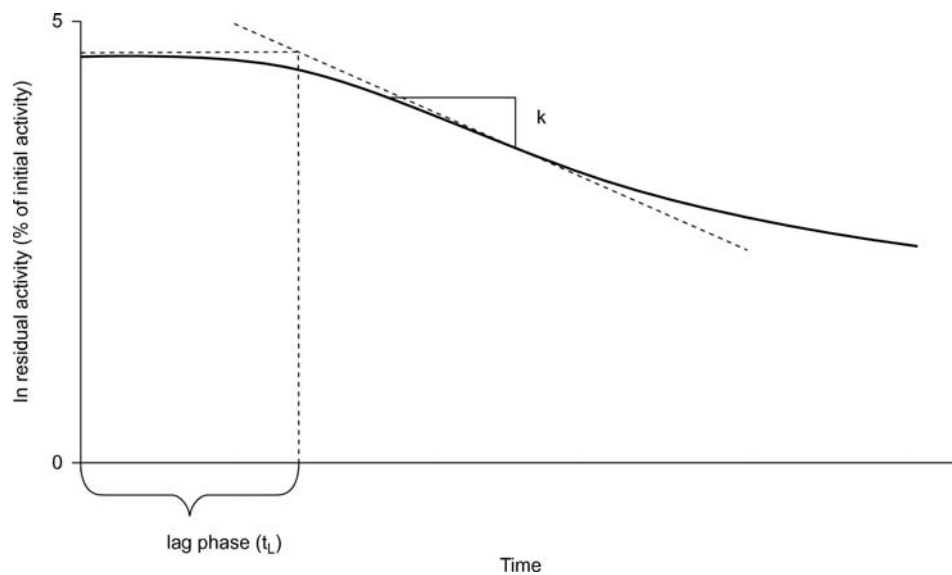


Figura 1b

Eżempju ta' plot semi-logaritmika (ln għall-attività li jifdal wara l-evaporazzjoni kontra l-hin).



▼ M6

C.26. TEST TAL-INIBIZZJONI TAT-TKABBIR TAL-ISPEĊI LEMNA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tat-Test (TG) 221 tal-OECD (2006). Huwa maħsub biex jivvaluta t-tossiċità tas-sustanzi kimiċi lill-pjanti akkwatiċi tal-ilma helu tal-ġeneru *Lemna* (duckweed). Huwa bbażat fuq il-metodi eżistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6) izda jinkludi modifikazzjonijiet ta' dawn il-metodi biex tiġi riflessa r-riċerka riċenti u l-konsultazzjoni fuq għadd ta' kwistjonijiet ewlenin. Dan il-Metodu ta' Ttestjar għe vvalidat minn ring test internazzjonali (7).
2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi l-ittestjar tat-tossiċità permezz ta' *Lemna gibba* u *Lemna minor*, li t-tnejn intużaw b'mod estensiv u huma s-suġġett tal-istandards imsemmija hawn fuq. It-tassonomija ta' *Lemna* spp. hija diffiċli, peress li hija kkomplicata bl-eżistenza ta' firxa wiesgħa ta' fenotipi. Għalkemm tista' ssehh varjabbiltà ġenetika fir-rispons għat-tossikanti b'*Lemna*, bħalissa hemm dejta insuffiċjenti dwar dan is-sors ta' varjabbiltà biex jiġi rakkomandat klonu speċifiku għall-użu ma' dan il-metodu ta' ttestjar. Ta' min jinnota li t-test ma jgħid li jkun akseniku, izda jittiehdu passi fi stadji matul il-proċedura tal-ittestjar biex il-kontaminazzjoni minn organiżmi oħra tinżamm kemm jista' jkun baxxa.
3. Huma deskritti d-dettalji tal-ittestjar b'tiġdid (semistatiku u bi fluss kontinwu) u mingħajr tiġdid (statiku) tas-soluzzjoni tat-test. Skont l-oġġettivi tal-ittestjar u r-rekwiżiti regolatorji, huwa rakkomandat li tiġi kkunsidrata l-applikazzjoni ta' metodi semistatiku u bi fluss kontinwu, eż. għal sustanzi kimiċi li jintilfu rapidament minn soluzzjoni bħala riżultat ta' volatilizzazzjoni, fotodegradazzjoni, preċipitazzjoni jew bijodegradazzjoni. F'(8) tingħata gwida ulterjuri.
4. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAL-ITTESTJAR

5. Kulturi ta' pjanti li jikbru b'mod esponenzjali tal-ġeneru *Lemna* jistgħu jikbru bħala monokulturi f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test f'perjodu ta' sebat ijiem. L-oġġettiv tal-ittestjar huwa li jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi fuq it-tkabbir veġettativ matul dan il-perjodu abbażi ta' valutazzjonijiet tal-varjabbli ta' kejl magħżula. L-għadd ta' frondi huwa l-varjabbli ta' kejl primarju. Tal-inqas jitkejjel ukoll varjabbli ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk), peress li xi sustanzi kimiċi jistgħu jaffettwaw varjabbli ta' kejl oħra ħafna iktar mill-għadd ta' frondi. Biex jiġu kkwantifikati l-effetti relatati mas-sustanza, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel ma' dak tal-kontrolli u l-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala $1-EC_x$ (eż. EC_{50}).
6. Dan il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-inibizzjoni tat-tkabbir, espress bħala ż-żieda logaritmika fil-varjabbli ta' kejl (rata ta' tkabbir speċifika medja) matul il-perjodu ta' espożizzjoni. Mir-rati medji ta' tkabbir speċifiku rreġistrati f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni li twassal għal rata ta' x % ta' inibizzjoni speċifika ta' tkabbir (eż. 50 %) hija ddeterminata u espressa bħala $1-E_rC_x$ (eż. E_rC_{50}).
7. Rispons varjabbli addizzjonali li jintuza f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huwa r-rendiment, li jista' jkun meħtieġ sabiex jiġu ssodisfati rekwiżiti regolatorji speċifiċi f'xi pajjiżi. Huwa ddefinit bħala l-varjabbli ta' kejl fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitneħħa l-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni. Mill-prodott rreġistrat f'serje ta' soluzzjonijiet tat-test, il-konċentrazzjoni ġgħib magħha x % speċifikat ta' rata ta' inibizzjoni ta' prodott (eż. 50 %) determinata u espressa bħala $1-E_yC_x$ (eż. E_yC_{50}).

▼ M6

8. Barra minn hekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

9. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku, b'sensittività adegwata għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fil-midjum tat-test.
10. Informazzjoni fuq is-sustanza kimika tat-test li tista' tkun utli biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, purità, solubilità tal-ilma, stabbiltà fl-ilma u dawl, pK_a , K_{ow} , pressjoni tal-fwar u bijodegradabilità. Is-solubilità fl-ilma u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-kostanti ta' Henry's Law, li sejr in jindikaw jekk huwiex probabbli telf sinifikanti fis-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tal-ittestjar. Dan sejjer jgħin biex jindika jekk għandhomx jittiehdu passi partikolari biex jiġi kkontrollat tali telf. Fejn l-informazzjoni dwar is-solubilità u l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test mhijiex ċerta, huwa rakkomandat li dawn jiġu vvalutati fil-kundizzjonijiet tat-test, jiġifieri l-midjum tat-tkabbir, it-temperatura, ir-regim tad-dawl li għandhom jintużaw fit-test.
11. Meta l-kontroll tal-pH tal-midjum tat-test ikun partikolarment importanti, eż. meta l-metalli jew is-sustanzi kimiċi tat-test li huma idrolitikament instabbli, hija rakkomandata zieda ta' bafer mal-midjum tat-tkabbir (ara paragrafu 21). Hija pprovduta gwida ulterjuri għas-sustanzi kimiċi tat-test bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluhom diffiċli biex jiġu ttestjati fi (8).

VALIDITÀ TAT-TEST

12. Biex it-test ikun validu, iż-żmien tal-irdoppjar tal-ghadd ta' frondi fil-kontroll għandu jkun inqas minn 2,5 jiem (60 siegħa), li jikkorrispondu għal zieda ta' bejn wiehded u iehor seba' darbjet f'sebat ijiem u rata ta' tkabbir speċifika medja ta' $0,275 d^{-1}$. Permezz tal-midjums u l-kundizzjonijiet tat-test deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar, dan il-kriterju jista' jinkiseb permezz ta' regim tal-ittestjar statiku (5). Huwa antiċipat ukoll li dan il-kriterju sejjer jintlaħaq f'kundizzjonijiet tat-test semistatiċi u bi fluss kontinwu. Il-kalkolu tal-hin għall-irdoppjar huwa indikat fil-paragrafu 49.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

13. Is-sustanza (sustanzi) ta' referenza bħal 3,5-diklorofenol użata fir-ring test internazzjonali (7), tista' tiġi ttestjata bħala mezz ta' vverifikar tal-proċedura tat-test. Huwa rakkomandat li tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza tal-inqas darbtejn f'sena jew, fejn jitwettaq ittestjar bi frekwenza inqas, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

14. It-tagħmir kollu f'kuntatt mal-midjums tat-test għandu jkun magħmul mill-ħgieg jew materjal kimikament inerti iehor. L-oġġetti tal-ħgieg li jintużaw għal finijiet ta' kulturi u ttestjar għandhom jitnaddfu minn kontaminanti kimiċi li jistgħu jinfiltrow fil-midjum tat-test u għandhom ikunu sterili. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu wiġġin biżżejjed għall-frondi ta' kolonji differenti fir-reċipjenti ta' kontroll biex jikbru minghajr ma jikkoincidu fi tmiem it-test. Ma tagħmilx differenza jekk l-għerug imissx mal-qighan tar-reċipjenti tat-test, iżda huwa rakkomandat fond minimu ta' 20 mm u volum

▼ M6

minimu ta' 100 mL f'kull reċipjent tat-test. L-għażla tar-reċipjenti tat-test mhijiex kritika sakemm jiġu sodisfatti dawn ir-rekwiziti. Il-bekkijiet tal-ħgieg, id-dixxijiet kristalizzanti jew id-dixxijiet tal-ħgieg petri b'dimensjonijiet xierqa kollha rriżultaw adegwati. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew biex titnaqqas l-evaporazzjoni u l-kontaminazzjoni aċċidentali, filwaqt li jippermettu l-bdil tal-arja meħtieġ. Reċipjenti tal-ittestjar xierqa, u b'mod partikolari l-ghotjien, għandhom jevitaw id-dell jew bidliet fil-karatteristiċi spettrali tad-dawl.

15. Il-kulturi u r-reċipjenti tat-test ma għandhomx jinżammu flimkien. Dan jint-lahaq bl-aħjar mod permezz ta' kompartimenti, inkubaturi, jew kmamar ta' tkabbir ambjentali separati. L-illuminazzjoni u t-temperatura għandhom ikunu kontrollabbli u miżmuma f'livell kostanti (ara l-paragrafi 35-36).

Organizmu tat-test

16. L-organizmu użat għal dan it-test huwa *Lemna gibba* jew *Lemna minor*. Fl-Appendiċi 2 jingħataw deskrizzjonijiet fil-qosor tal-ispeċijiet ta' duckweed li ntużaw għall-ittestjar tat-tossiċità. Il-materjal tal-pjanti jista' jinkiseb minn gabra tal-kultura, laboratorju iehor jew minn fuq il-post. Jekk jingħabru minn fuq il-post, l-impjanti għandhom jinżammu f'kultura fl-istess midjum kif użat għall-ittestjar għal minimu ta' tmien ġimghat qabel l-użu. Is-siti tal-oqsma użati għall-ġbir tal-kulturi tal-bidu għandhom ikunu mingħajr sorsi ovvji ta' kontaminazzjoni. Jekk jinkisbu minn laboratorju jew ġbir ta' kultura iehor, għandhom jinżammu bl-istess mod għal minimu ta' tliet ġimghat. Is-sors tal-materjal tal-pjanti l-ispeċi u l-klonu (jekk ikunu magħrufa) użati għall-ittestjar għandhom dejjem jiġu rrapportati.
17. Għandhom jintużaw monokulturi, li huma viżibbilment mingħajr kontaminazzjoni minn organiżmi oħra bħal algi u protozoa. Pjanti b'saħħithom ta' *L. minor* sejin jikkonsistu minn kolonji li jinkludu bejn zewġ frondi u hamsa filwaqt li kolonji b'saħħithom ta' *L. gibba* jista' jkun fihom sa seba' frondi.
18. Il-kwalità u l-uniformità tal-pjanti użati għall-ittestjar sejjer ikollhom influwenza sinifikanti fuq l-eżitu tal-ittestjar u għandhom għalhekk jintgħażlu b'attenzjoni. Għandhom jintużaw pjanti żgħar li jikbru rapidament mingħajr leżjonijiet jew diskolorazzjoni (klorozi) evidenti. Kulturi ta' kwalità tajba huma indikati minn inċidenza għolja ta' kolonji li jinkludu tal-inqas zewġ frondi. Numru kbir ta' frondi uniċi huwa indikattiv ta' stress ambjentali, eż. limitazzjoni ta' nutrijenti, u ma għandux jintużaw materjal ta' pjanti minn tali kulturi għall-ittestjar.

Kultivazzjoni

19. Biex titnaqqas il-frekwenza taż-żamma tal-kultura (eż. meta jkunu ppjanati testjiet ta' *Lemna* għal perjodu), il-kulturi jistgħu jinżammu f'illuminazzjoni u temperatura mnaqqsin (4 — 10 °C). Dettalji tal-kulturi jingħataw fl-Appendiċi 3. Sinjali ovvji ta' kontaminazzjoni minn algi jew organiżmi oħra jaf ikunu jeħtieġu sterilizzazzjoni tal-wiċċ ta' sottokampjun ta' frondi ta' *Lemna*, segwita minn trasferiment għal midjum ġdid (ara l-Appendiċi 3). F'din l-eventwalità, il-kultura kontaminata li jifdal għandha tintrema.
20. Tal-inqas sebat ijiem qabel l-ittestjar, bizzejjed kolonji jiġu ttrasferiti b'mod asettiku f'midjum sterili ġdid u kkulturati għal 7 — 10 ijiem f'kundizzjonijiet tat-test.

Midjum tat-test

21. Huma rakkomandati midjums differenti għal *Lemna minor* u *Lemna gibba*, kif deskritt hawn taht. Għandha tingħata kunsiderazzjoni b'attenzjoni ta' bafer ta' pH fil-midjum tat-test (MOPS (aċidu sulfoniku ta' 4-morfolinapropen, Nru CAS: 1132-61-2) fil-midjum *L. minor* u NaHCO₃ fil-midjum *L. gibba*) meta jkun suspettat li dan jista' jkollu reazzjoni mas-sustanza kimika tat-test u jinfluwenza l-espressjoni tat-tossiċità tagħha. Il-Midjum ta' Steinberg (9) huwa aċċettabbli wkoll sakemm jiġu sodisfatti l-kriterji ta' validità.

▼ M6

22. Hija rakkomandata modifikazzjoni tal-midjum ta' tkabbir *Lemna* tal-istandard Svediż (SIS) għall-kulturi u l-ittestjar b'L. minor. Fl-Appendiċi 4 tinghata l-kompożizzjoni ta' dan il-midjum.
23. Huwa rakkomandat il-midjum tat-tkabbir, 20X — AAP, kif deskritt fl-Appendiċi 4, għall-kulturi u l-ittestjar b'L. *gibba*.
24. Il-midjum Steinberg, kif deskritt fl-Appendiċi 4, huwa xieraq ukoll għal *L. minor*, iżda jista' jintuża wkoll għal *L. gibba* sakemm jiġu sodisfatti l-kriterji ta' validità.

Soluzzjonijiet tal-ittestjar

25. Is-soluzzjonijiet tal-ittestjar, ġeneralment jiġu ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza kimika tat-test normalment jiġu ppreparati billi tinhall is-sustanza kimika fil-midjum tat-tkabbir.
26. Il-konċentrazzjoni l-iktar oghla ttestjata tas-sustanza kimika tat-test ma għandhiex normalment taqbeż is-solubbiltà fl-ilma tas-sustanza kimika f'kundizzjonijiet tat-test. Madankollu għandu jiġi nnotat li *Lemna* spp. jżommu f'wiċċ l-ilma u jaf ikunu esposti għal sustanzi kimiċi li jingabru bejn l-ilma u l-arja (eż. sustanzi kimiċi li ma tantx jinhallu fl-ilma jew idrofobiċi jew sustanzi kimiċi tensjoattivi). F'tali ċirkostanzi, sejjer ikun hemm espożizzjoni mill-materjal minbarra fis-soluzzjoni u l-konċentrazzjonijiet tat-test jistgħu, skont il-karatteristiċi tas-sustanza kimika tat-test, jaqbzū, is-solubbiltà fl-ilma. Għas-sustanzi kimiċi tat-test ta' solubbiltà fl-ilma baxxa, jaf ikun mehtieg li tiġi ppreparata soluzzjoni ewlenija kkonċentrata jew dispersjoni tas-sustanza kimika permezz ta' solvent organiku jew aġent dispersiv sabiex tiġi ffaċilitata ż-żieda ta' kwantitajiet preċiżi tas-sustanza kimika tat-test mal-midjum tat-test u tiġi meghjuna fid-dispersjoni u x-xoljiment tagħha. Għandu jsir kull sforz possibbli biex jiġi evitat l-użu ta' tali materjali. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossicità li tirriżulta mill-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi awżiljarji. Pereżempju, solventi li jintużaw b'mod komuni li ma jikkawżawx fitotossicità fil-konċentrazzjonijiet sa 100 µl/l jinkludu aċetun u dimetilformamid. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv, għandha tiġi rrapportata l-konċentrazzjoni finali tiegħu li għandha tinżamm kemm jista' jkun baxxa (≤ 100 µl/l), u t-trattamenti u l-kontrolli kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv. F'(8) inghatat gwida ulterjuri dwar l-użu ta' aġenti dispersivi.

Gruppi tat-test u ta' kontroll

27. Għarfien minn qabel tat-tossicità tas-sustanza kimika tat-test għal *Lemna*, eż. minn test tas-sejba tal-medda, sejjer jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa. Fit-test finali tat-tossicità, normalment għandu jkun hemm tal-inqas hames konċentrazzjonijiet tat-test irrangati f'serje ġeometrika. Preferibbilment il-fattur ta' separazzjoni bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma għandhomx ikunu ikbar minn 3,2, iżda jista' jintuża valur ikbar fejn il-kurva tal-konċentrazzjoni/rispons hija dritta. Għandha tinghata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn hames konċentrazzjonijiet. Għandhom jintużaw tal-inqas tliet repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test.
28. Fl-istabbiliment tal-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (għas-sejba tal-medda u/jew għat-test finali tat-tossicità), għandu jiġi kkunsidrat li ġej:
 - Biex tiddetermina EC_x , il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex tiżgura livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula l- EC_{50} , l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal- EC_{50} . Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkun kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli,
 - Jekk l-għan huwa li jiġu stmati l-LOEC/NOEC, l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ma jkunx sinifikament iktar baxx minn dak tal-kontroll. Barra minn hekk,

▼ M6

l-oghla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ikun ferm inqas milli fil-kontroll. Jekk dan ma jkunx il-każ, it-test għandu jiġi ripetut permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni differenti (sakemm l-oghla konċentrazzjoni tkun fil-limitu tas-solubbiltà jew il-konċentrazzjoni limitu meħtieġa massima, eż. 100 mg/l).

29. Kull test għandu jinkludi kontrolli li jikkonsistu mill-istess midjum ta' nutri-jenti, in-numru ta' frondi u kolonji, il-kundizzjonijiet ambjentali u l-proċeduri bħar-riċipjenti tat-test iżda mingħajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv awżiljari, għandu jiġi inkluż trattament ta' kontroll addizzjonali bis-solvent/aġent dispersiv preżenti fl-istess konċentrazzjoni bħar-riċipjenti bis-sustanza kimika tat-test. In-numru ta' repliki tar-riċipjenti ta' kontroll (u r-riċipjenti tas-solventi, jekk ikun applikabbli) għandu tal-inqas ikun l-istess, u idealment darbtejn, in-numru ta' riċipjenti użati għal kull konċentrazzjoni tat-test.
30. Jekk ma tkunx meħtieġa determinazzjoni tal-NOEC, id-disinn tal-ittestjar jista' jiġi mmodifikat biex jizdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. Madankollu, in-numru ta' repliki ta' kontroll għandu jkun tal-inqas tlieta.

Espożizzjoni

31. Kolonji li jikkonsistu minn 2 sa 4 frondi viżibbli huma ttrasferiti mill-kultura tal-inokulu u jiġu assenjati b'mod każwali għar-riċipjenti tat-test f'kundizzjonijiet asettici. Kull riċipjent tat-test għandu jkun fih total ta' 9 sa 12-il frond. In-numru ta' frondi u kolonji għandu jkun l-istess f'kull riċipjent tat-test. L-esperjenza miksuba b'dan il-metodu u d-dejta tar-ring test indikaw li l-użu ta' tliet repliki għal kull trattament, b'kull replikat li fil-bidu jkun fih 9 sa 12-il frond, huwa biżżejjed biex jiġu skoperti differenzi fit-tkabbir ta' madwar 4 sa 7 % tal-inibizzjoni kkalkolata mir-rata ta' tkabbir (10 sa 15 % ikkalkolata mir-rendiment) bejn it-trattamenti (7).
32. Huwa meħtieġ disinn aleatorju għal-lokazzjoni tar-riċipjenti tat-test fl-inkubatur biex titnaqqas l-influwenza tad-differenzi spazjali fl-intensità tad-dawl jew it-temperatura. Huma meħtieġ ukoll disinn ibblokkjat jew ripożizzjona-ment każwali tar-riċipjenti meta jsiru l-osservazzjonijiet (jew ripożizzjona-ment iktar frekwenti).
33. Jekk test tal-istabbiltà preliminari juri li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tistax tinżamm (jiġifieri l-konċentrazzjoni mkejla taqa' taħt it-80 % tal-konċentrazzjoni inizjali mkejla) matul id-durata tat-test (7 ijiem), huwa rakkomandat reġim tal-ittestjar semistatiku. F'dan il-każ, il-kolonji għandhom ikunu esposti għal testijiet li għadhom kif jiġu ppreparati u s-soluzzjonijiet ta' kontroll f'tal-anqas żewġ okkażjonijiet matul it-test (eż. il-jiem 3 u 5). Il-frekwenza ta' espożizzjoni għal midjum ġdid sejra tiddependi fuq l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test; frekwenza oghla jaf tkun meħtieġa biex jinżammu konċentrazzjonijiet viċin għall-kostanti ta' sustanzi kimiċi volatili u mhux stabbli hafna. F'xi ċirkostanzi, jaf tkun meħtieġa proċedura bi fluxs kontinwu (8)(10).
34. Ix-xenarju ta' espożizzjoni permezz ta' applikatur tal-weraq (sprej) mhuwiex kopert f'dan il-metodu ta' ttestjar; minflok, ara (11).

Kundizzjonijiet tal-inkubazzjoni

35. Dawl kontinwu fluworexxenti shun jew frisk għandu jintuża biex jipprovdi intensità tad-dawl magħzula minn għażla ta' 85-135 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ meta mkejjel f'radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) f'punti fl-istess distanza mis-sors ta' dawl bħall-frondi Lemna (ekwivalenti għal 6 500-10 000 lux). Kwalunkwe differenza mill-intensità tad-dawl magħzula fl-erja

▼ **M6**

tal-ittejtjar ma għandhiex taqbeż il-medda ta' $\pm 15\%$. Il-metodu ta' detezzjoni u kejl, b'mod partikolari t-tip ta' senser, sejjer jaffettwa l-valur imkejjel. Is-sensers sferiċi (li jirrispondu għad-dawl minn angoli 'l fuq u taht il-pjan ta' kejl) u s-sensers "cosine" (li jirrispondu għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl) huma ppreferuti minn sensers unidirezżjonali, u ser jagħtu riżultati tal-qari oġġla, għal sors ta' dawl b'hafna punti tat-tip deskritt hawn-hekk.

36. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test għandha tkun ta' $24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il-pH tal-midjum ta' kontroll ma għandux jiżdied b'aktar minn 1.5 unitajiet matul it-test. Madankollu, devjazzjoni ta' iktar minn 1.5 unità ma tinvalidax it-test meta jkun jista' jintwera li ġew sodisfatti l-kriterji ta' validità. Hija mehtieġa iktar attenzjoni f'każijiet speċjali bħal meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi mhux stabbli jew metalli. Ara (8) għal gwida ulterjuri.

Perjodu

37. It-test jintemm 7 ijiem wara li l-pjanti jiġu ttrasferiti fir-reċipjenti tat-test.

Kejl u determinazzjonijiet analitiċi

38. Fil-bidu tat-test, jingħadd u jiġi rreġistrat in-numru ta' frondi fir-reċipjenti tat-test, filwaqt li jiġi żgurat li jittiehed kont tal-frondi vizibbli b'mod evidenti li jisporgu 'l barra. In-numru ta' frondi li jidher normali jew anormali, jehtieġ li jiġi ddeterminat fil-bidu tat-test, tal-inqas darba kull 3 ijiem matul il-perjodu ta' espożizzjoni (jiġifieri tal-inqas 2 okkażjonijiet matul il-perjodu ta' 7 ijiem) u fi tmiem ti-test. Għandhom jiġu nnotati l-bidliet fl-iżvilupp tal-impjant, eż. d-daqs tal-frond, id-dehra, l-indikazzjoni ta' nekrozi, klorozi jew gibbożità, it-tifrik ta' kolonja jew it-telf taż-żamma fil-wieċ, u fit-tul u d-dehra tal-għeruq. Għandhom jiġu nnotati wkoll karatteristiċi sinifikanti tal-midjum tat-test (eż. preżenza ta' materjal mhux mahlul, tkabbir ta' algi fir-reċipjenti tat-test).

39. Minbarra d-determinazzjoni tan-numru ta' frondi matul it-test, huma vvalutati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq wiehed (jew iktar) mill-varjabbli ta' kejl li ġejjin:

(i) erja totali tal-frond,

(ii) piż xott,

(iii) piż frisk.

40. L-erja totali tal-frondi għandha vantaġġ, li tista' tiġi ddeterminata għal kull reċipjent tat-test u ta' kontroll fil-bidu, matul u fi tmiem it-test. Fil-bidu tal-ittejtjar għandu jiġi ddeterminat il-piż xott jew frisk minn kampjun tal-kultura tal-inokulu li jirrappreżenta x'jintuza fil-bidu tat-test, u fi tmiem l-ittejtjar bil-materjal tal-impjant minn reċipjent tat-test u ta' kontroll. Jekk ma titkejjilx l-erja tal-frond, il-piż xott huwa ppreferut mill-piż frisk.

41. L-erja totali tal-frond, il-piż xott u l-piż frisk jistgħu jiġu ddeterminati kif ġej:

(i) *Erja totali tal-frond*: L-erja totali tal-frond tal-kolonji kollha tista' tiġi ddeterminata b'analizi tal-immagnijiet. Tista' tittiehed il-forma tar-reċipjent tat-test u l-pjanti permezz ta' kamera bil-vidjo (jiġifieri billi r-reċipjent jitqiegħed fuq kaxxa tad-dawl) u l-immagni li tirriżulta tiġi digitizzata. Bil-kalibrizzjoni b'forom ċatti ta' erja magħrufa, tista' tiġi ddeterminata l-erja totali tal-frond f'reċipjent tat-test. Wiehed għandu joqgħod attent biex jeskludi interferenza kkawżata mir-rimm tar-reċipjent tat-test. Approċċ alternattiv izda iktar impenjattiv huwa li jiġu fotokopjati r-reċipjenti tat-test u l-pjanti, tinqata' l-forma li tirriżulta tal-kolonji u tiġi ddeterminata l-erja tagħhom permezz ta' analizzatur tal-erja tal-weraq fuq karta tal-graffs. Jaf ikunu xierqa wkoll tekniki oħra (eż. il-proporzjon tal-piż tal-karta bejn l-erja tas-siluwett tal-kolonji u l-unità tal-erja).

▼ M6

- (ii) *Piż xott*: Il-kolonji kollha jingabru minn kull wieħed mir-reċipjenti tat-test u jitlahalhu b'ilma distillat jew dejonizzat. Dawn jiġu xxugati biex jitneħħa l-ilma żejjed u mbagħad jitnixxfu f'60 °C sa piż kostanti. Għandu jiġi inkluż kwalunkwe framment tal-għerquq. Il-piż xott għandu jiġi espress għal preċiżjoni ta' mill-anqas 0,1 mg.
- (iii) *Piż frisk*: Il-kolonji kollha huma ttrasferiti għal tubi ta' polistiren (jew materjal inerti ieħor) li ntiżnu minn qabel b'toqob żgħar (1 mm) fil-qiegħ tondi. Imbagħad it-tubi jiġu ċentrifugati f'3 000 rpm għal 10 minuti f'temperatura tal-ambjent. Tubi, li fihom kolonji li issa nixfu, jergġghu jintiżnu u l-piż frisk jiġi kkalkolat billi jitnaqqas il-piż tat-tubu vojti.
- Frekwenza tal-kejl u d-determinazzjonijiet analitiċi
42. Jekk jintuza disinn ta' test statiku, għandha titkejjel il-pH ta' kull trattament fil-bidu u fi tmiem it-test. Jekk jintuza disinn tat-test semistatiku, il-pH għandha titkejjel f'kull lott ta' soluzzjoni tat-test “ġdid” qabel kull tiġdid u anki fis-soluzzjonijiet korrispondenti “użati”.
43. L-intensità tad-dawl għandha titkejjel fil-kompartiment, l-inkubatur jew il-kamra tat-tkabbir f'punti li jinsabu fl-istess distanza mis-sors tad-dawl bħall-frondi *Lemna*. Il-kejl għandhom isiru tal-inqas darba matul it-test. It-temperatura tal-midjum freċipjent surrogat miżmum fl-istess kundizzjonijiet fil-kompartiment tat-tkabbir, l-inkubatur jew il-kamra għandha tiġi rreġistrata tal-inqas kuljum.
44. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test huma ddeterminati f'intervalli xierqa. F'testijiet statiki, ir-rekwiżit minimu huwa li jiġu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet fil-bidu u fi tmiem it-test.
45. F'testijiet semistatiki li fihom il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx mistennija li tibqa' fi hdan $l \pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni nominali, huwa mehtieġ li jiġu analizzati s-soluzzjonijiet tat-test li għadhom kif jiġu ppreparati u l-istess soluzzjonijiet f'kull tiġdid (ara l-paragrafu 33). Madankollu, għal dawk it-testijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejjla tas-sustanza kimika tat-test hija fi hdan $l \pm 20\%$ tan-nominali iżda fejn tista' tingħata biżżejjed evidenza biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (jiġifieri fi hdan il-medda 80 — 120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitwettqu biss fuq l-ogħla jew l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test qabel it-tiġdid għandha ssir biss fuq reċipjent tar-replikat wieħed f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-reċipjenti miġbura mir-replikat).
46. Jekk jintuza test bi fluss kontinwu, reġim ta' kampjunar simili għal dak deskritt għat-testijiet semistatiki, inkluż analiżi fil-bidu, fin-nofs u fit-tmiem it-test, huwa xieraq, iżda l-kejl ta' soluzzjonijiet użati mhuwiex xieraq f'dan il-każ. F'dan it-tip ta' test, ir-rata ta' fluss tad-dilwent u s-sustanza kimika tat-test jew is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu ċekkati kuljum.
47. Jekk ikun hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li qiegħda tiġi ttestjata nżammet b'mod sodisfaċenti fi hdan il-konċentrazzjoni ta' $\pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejjla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejjla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejjla ma tkunx fi hdan il-medda ta' $\pm 20\%$, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja ġeometrika matul l-espożizzjoni jew il-mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (8).

▼ **M6****Test tal-limitu**

48. F'ċerti ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test ma għandha ebda effetti tossiċi f'koncentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu ta' solubbiltà tagħha fil-midjum tat-test (irrispettivament minn liema huwa l-inqas), jista' jsir test tal-limitu li jinvolve tqabbil tar-risponsi fi grupp ta' kontroll u grupp ta' trattament partikolari (100 mg/l jew koncentrazzjoni daqs il-limitu ta' solubbiltà). Huwa rakkomandat hafna li dan jiġi appoġġjat minn analiżi tal-koncentrazzjoni tal-espożizzjoni. Japplikaw il-kundizzjonijiet tat-test u l-kriterji ta' validità deskritti preċedement kollha għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandhom jiġu dduplikati. It-tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-midjums, eż. Test-t ta' Student.

DEJTA U RAPPORTAR**Hin għall-irdoppjar**

49. Biex jiġi ddeterminat il-hin għall-irdoppjar (T_d) tan-numru ta' frondi u l-konformità ma' dan il-kriterju ta' validità mill-istudju (paragrafu 12), tintuża l-formola li ġejja b'dejta miksba mir-reċipjenti ta' kontroll:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

fejn μ hija r-rata ta' tkabbir speċifika medja ddeterminata kif deskritt fil-paragrafi 54-55.

Varjabbli ta' rispons

50. Il-fini tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv ta' *Lemna*. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jiddeskrivi żewġ fatturi ta' rispons, peress li ġurisidizzjonijiet differenti għandhom preferenzi u htigijiet regolatorji differenti. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli fil-ġurisidizzjonijiet kollha, l-effetti għandhom jiġu evalwati permezz taż-żewġ varjabbli tar-rispons (a) u (b) deskritti hawn taht.
- (a) *Rata ta' tkabbir speċifika medja*: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat fuq il-bażi tal-bidliet fil-logaritmi tan-numru ta' frondi, u barra minn hekk, fuq il-bażi tal-bidliet fil-logaritmi ta' parametru ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) maż-żmien (espress għal kull jum) fil-kontrolli u kull grupp ta' trattament. Xi drabi jissejjah bhala r-rata ta' tkabbir relattiva (12).
- (a) *Rendimento*: dan il-varjabbli ta' rispons huwa kkalkolat fuq il-bażi tal-bidliet fin-numru ta' frondi, u barra minn hekk, fuq il-bażi tal-bidliet fil-parametru ta' kejl ieħor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) fil-kontrolli u f'kull grupp ta' trattament sa tmiem it-test.
51. Għandu jiġi nnotat li l-valuri tat-tossiċità kkalkolati permezz ta' dawn iż-żewġ varjabbli ta' rispons ma jistgħux jitqabblu u din id-differenza għandha tiġi rikonnoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq rata medja ta' tkabbir speċifiku ($E_r C_x$) ikunu ġeneralment oghla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment ($E_y C_x$) jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-Metodu ta' ttestjar jiġu rrispettati, minhabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Dan ma għandux jiġi interpretat bhala d-differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli ta' rispons, iżda semplicement li li l-valuri huma matematikament differenti. Il-kuncett ta' rata ta' tkabbir speċifika medja huwa bbażat fuq il-mudell ta' tkabbir esponenzjali tad-duckweed f'kulturi mhux limitati, fejn it-tossiċità hija stmata abbażi tal-effetti fuq ir-rata ta' tkabbir, mingħajr ma tiddependi fuq il-livell assolut tar-rata ta' tkabbir speċifika tal-kontroll, il-pendil tal-kurva tal-koncentrazzjoni/rispons jew fuq id-durata tat-test. B'kuntrast, ir-riżultati bbażati fuq il-varjabbli tar-rispons tar-rendiment jiddependu fuq dawn il-varjabbli l-oħra kollha. $E_y C_x$ hija dipendenti fuq ir-rata speċifika ta' tkabbir tal-ispeċje tad-duckweed użata fit-test u

▼ **M6**

fuq ir-rata massima speċifika ta' tkabbir li tista' tvarja bejn speċi jew anki kloni differenti. Dan ir-rispons varjabbli għandux jintuża għat-tqabbil tas-sensittività għat-tossikanti fost l-ispeċijiet ta' duckweed jew anki kloni differenti. Filwaqt li l-użu tar-rata ta' tkabbir speċifika għall-istima tat-tossicità hija xjentifikament ppreferuta, l-istimi tat-tossicità ibbażati fuq ir-rendiment huma inkluzi wkoll f'dan il-Metodu ta' Ttestjar biex jiġu ssodisfati r-rekwiziti regolatorji attwali f'xi ġurisdizzjonijiet.

52. L-istimi tat-tossicità għandhom ikunu bbażati fuq in-numru ta' frondi u fuq varjabbli ta' kejl addizzjonali wiehed (erja totali tal-frond, piż xott jew piż frisk) peress li xi sustanzi kimiċi jistgħu jaffettwaw varjabbli ta' kejl ohra hafna iktar min-numru ta' frondi. L-effett ma jiġix identifikat bil-kalkolu tan-numru ta' frondi biss.
53. In-numru ta' frondi, kif ukoll kwalunkwe varjabbli ta' kejl irregistrat iehor, jiġifieri l-erja totali tal-frondi, il-piż xott jew il-piż frisk, huma tabulati flimkien mal-koncentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għal kull okkażjoni ta' kejl. Analizi tad-dejta sussegwenti eż. biex tikkalkula LOEC, NOEC jew EC_x għandhom ikunu bbażati fuq il-valuri għar-repliki individwali u mhux fuq medji kkalkulati għal kull grupp ta' trattament.

Rata ta' tkabbir speċifika medja

54. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għal perjodu speċifiku hija kkalkolata bħala ż-zieda logaritmika fil-varjabbli tat-tkabbir — in-numru tal-frondi u varjabbli ta' kejl iehor (erja totali tal-frondi, piż xott jew piż frisk) — permezz tal-formola ta' hawn taht għal kull replikat ta' kontroll u t-trattamenti:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

fejn:

- μ_{i-j} : rata ta' tkabbir speċifika medja mill-hin i sa j
- N_i : varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'hin i
- N_j : varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'hin j
- t : perjodu ta' hin minn i sa j

Għal kull grupp ta' trattament u kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

55. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għandha tiġi kkalkolata għall-perjodu ta' ttestjar kollu (il-hin “i” fil-formola ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-hin “j” huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir speċifika medja flimkien mal-istimi tal-varjanza. Barra minn hekk, għandha tiġi vvalutata r-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jsehhu matul il-perjodu ta' espożizzjoni (eż. billi jiġu spezzjonati l-kurvi ta' tkabbir ittrasformati mil-log). Differenzi sostanzjali bejn ir-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni u r-rata ta' tkabbir medja jindikaw devjazzjoni minn tkabbir esponenzjali kostanti u li hija ggarantita eżaminazzjoni mill-qrib tal-kurvi ta' tkabbir. F'dan il-każ, approċċ konservattiv ikun li jitqabblu rati ta' tkabbir speċifiċi minn kulturi ttrattati matul il-perjodu tal-hin tal-inibizzjoni massima għal dawk għall-kontrolli matul l-istess perjodu ta' żmien.
56. Persentaġġ ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formola li ġejja:

▼ **M6**

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

fejn:

- % I_r : inibizzjoni perċentwali fir-rata ta' tkabbir speċifika medja;
- μ_C : valur medju għal μ fil-kontroll
- μ_T : valur medju għal μ fil-grupp ta' trattament

Rendiment

57. L-effetti fuq ir-rendiment huma ddeterminati abbażi ta' żewġ varjabbli ta' kejl, in-numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl iehor (erja totali tal-frond, piż xott jew piż frisk) preżenti f'kull reċipjent tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test. Għal piż xott jew piż frisk, il-bijomassa tal-bidu hija ddeterminata abbażi ta' kampjun tal-frondi meħud mill-istess lott użat biex jiġu inokulati r-reċipjenti tat-test (ara l-paragrafu 20). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. L-inibizzjoni perċentwali medja fir-rendiment (% I_y) tista' tiġi kkalkolata għal kull grupp ta' trattament kif ġej:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

fejn:

- % I_y : tnaqqis perċentwali fir-rendiment
- b_c : bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll
- b_T : bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

Ipplottjar tal-kurvi konċentrazzjoni rispons

58. Għandhom jiġu pplotjtat kurvi konċentrazzjoni rispons relatati mal-inibizzjoni perċentwali tal-varjabbli ta' rispons (I_r , jew I_y ikkalkolati kif indikati fil-paragrafu 56 jew 57) u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tat-test.

Estimi ta' EC_x

59. Estimi ta' EC_x (eż. EC_{50}) għandhom dejjem ikunu bbażati kemm fuq ir-rata medja ta' tkabbir speċifiku (E_rC_x) kif ukoll fuq ir-rendiment (E_yC_x), u t-tnejn li huma għandhom ikunu bbażati fuq l-għadd tal-frondi u varjabbli iehor ta' kejl (erja totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk). Dan huwa minhabba li hemm sustanzi kimiċi tat-test li jaffettwaw in-numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl b'mod differenti. Il-parametri ta' tossiċità mixtieqa huma għalhekk erba' valuri EC_x għal kull livell ta' inibizzjoni kkalkulat: E_rC_x (numru ta' frond); E_rC_x (area totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk); E_yC_x (numru ta' frond); u E_yC_x (area totali ta' frond, piż niexef, jew piż frisk).

Proċeduri ta' statistika

60. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analizi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ppeżata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-dejta dwar ir-rispons — eż. f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (13), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmanigġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli fid-dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet uniformi. Meta jkun viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistghu jtkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analizi (13). Għandu jiġi nnotat li metodi standard ta' analizi permezz ta' trasformati ta' probit, logit jew Weibull huma mahsuba għall-użu f'dejta kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u

▼ **M6**

għandhom jiġu mmodifikati biex jakkomodaw id-dejta dwar ir-rata ta' tkabbir jew ir-rendiment. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni ta' valuri EC_x minn data kontinwa jistghu jinstabu f'(14), (15), u (16).

61. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x . Fejn ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. Kemm toqghod tajjeb id-dejta dwar ir-rispons għall-mudell ta' rigressjoni għandu jiġi vvalutat grafikament jew statistikament. L-analiżi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament.
62. Stimu EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistghu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (17), jekk il-mudelli/metodi ta' rigressjoni aċċessibbli m'humiex xierqa għad-data.
63. Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa meħtieġ li jitqabblu l-medji ta' trattament permezz ta' analiżi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni għandha mbagħad titqabbel mal-medja ta' kontroll permezz ta' tqabbil multiplu xieraq jew test ta' tendenza. It-test ta' Dunnett jew ta' Williams jista' jkun utili (18)(19)(20)(21). Huwa meħtieġ li jiġi vvalutat jekk treggix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta' varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettaq grafikament jew b'test formali (22). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omoġeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tiġi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tiġi kkunsidrata analiżi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. F'(16) tista' tinstab gwida addizzjonali li tiddetermina l-NOEC.
64. Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimu EC_x ta' punti bbażati fuq rigressjoni. Valur xieraq għal x ma ġiex stabbilit għal dan it-test ta' *Lemna*. Madankollu, sensiela ta' minn 10 sa 20 % tidher xierqa (tiddependi fuq il-varjabbli ta' rispons magħżul), u preferibbilment l- EC_{10} u l- EC_{20} għandhom jiġu rrapurtati t-tnejn li huma.

Rapportar

65. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tal-ittestjar:

- natura fiżika u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti, inkluż il-limitu tas-solubbiltà fl-ilma;
- dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (eż. Numru CAS), inkluż il-purità (impuritajiet).

Speċijiet tat-test:

- isem xjentifiku, klonu (jekk ikun magħruf) u sors.

Kundizzjonijiet tal-ittestjar:

- proċedura tal-ittestjar użata (statika, semistatika jew bi fluss kontinwu);
- id-data tal-bidu tal-ittestjar u d-durata tiegħu;
- midjum tat-test;
- deskrizzjoni tad-disinn sperimentali: reċipjenti u għotjien tat-test, volumi ta' soluzzjonijiet, numru ta' kolonji u frondi għal kull reċipjent tat-test fil-bidu tat-test;
- il-konċentrazzjonijiet tat-test (nominali u mkejla kif xierqa) u n-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni;

▼ **M6**

- metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u tat-test inkluz l-użu ta' kwalunkwe solvent jew agent dispersiv;
- temperatura matul it-test;
- sors ta' dawl, intensità tad-dawl u omoġenità;
- valuri tal-pH tal-midjums tat-test u ta' kontroll;
- konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u l-metodu tal-analiżi b'dejta ta' valutazzjoni tal-kwalità xierqa (studji ta' validazzjoni, devjazzjonijiet standard jew limiti ta' kunfidenza tal-analizijiet);
- metodi għad-determinazzjonijiet tan-numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl oħrajn, eż. piż xott, piż frisk jew erja tal-frond;
- id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

Riżultati:

- dejta mhux ipproċessata: numru ta' frondi u varjabbli ta' kejl oħra f'kull reċipjent tat-test u ta' kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni ta' analiżi;
- medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;
- kurvi ta' tkabbir għal kull konċentrazzjoni tat-test (rakkomandati b'varjabbli ta' kejl ittrasformati bil-log, ara l-paragrafu 55);
- ħin għall-irdoppjar/rata ta' tkabbir fil-kontroll abbażi tan-numru ta' frondi;
- il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;
- rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett;
- stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi għal varjabbli ta' rispons eż. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikunu kkalkolati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;
- jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti);
- kwalunkwe stimolazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament;
- kwalunkwe sinjal viżwali tal-fitotossicità kif ukoll l-osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test;
- diskussjoni tar-riżultati, inkluz kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

▼ M6

- (5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (9) Organizazzzjoni Internazzzjoni għall-Istandardizzazzjoni (International Organization for Standardization.). ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.
- (10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 18. September 1977.
- (11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (22) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Għall-finijiet ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar jintużaw id-definizzjonijiet u l-abbrevazzjonijiet li ġejjin:

Il-bijomassa hija l-piż xott tal-materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test, is-surrogati għall-bijomassa, bħall-ghadd ta' frondi jew l-erja tal-frondi, ġeneralment jitkejlu u għalhekk l-użu tat-terminu “bijomassa” jirreferi għal dawn il-kejljet ta' surrogati wkoll.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

Klorożi hija s-sfurija tat-tessut ta' frond.

Klonu huwa organiżmu jew ċellola li nholqot minn individwu singolu b'riproduzzjoni asseswali. Għalhekk, l-individwi mill-istess klonu huma ġenetikament identiċi.

Kolonja tfisser aggregat ta' frondi ommijiet u bniet (ġeneralment 2 sa 4) imwahrha ma' xulxin. Xi drabi jissejhu pjanta.

EC_x hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mahlula fil-midjum tat-test li tirriżulta f'naqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir ta' *Lemna* f'perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat (li għandu jissejma b'mod espliċitu jekk ikun hemm devjazzjoni mid-durata tat-test kollu jew normali). Sabiex issir denotazzjoni li ma hijiex ambigwa ta' valur ta' EC li jidderiva mir-rata ta' tkabbir jew rendiment, is-simbolu “E_xC” huwa użat għar-rata ta' tkabbir u “E_yC” huwa użat għar-rendiment, segwit mill-varjabbli ta' kejl użat, eż. E_rC (għadd ta' frond).

Bi fluss kontinwu huwa test fejn is-soluzzjonijiet tat-test jiġu ssostitwiti b'mod kontinwu.

Fron huwa struttura individwali/unika “qisha werqa” ta' pjanta duckweed. Hija l-iżgħar unità, jiġifieri individwu, li jista' jirriproduċi.

Gibbożità tfisser frondi li huma mħattbin jew minfuħin.

Tkabbir hija zieda fil-varjabbli ta' kejl, eż. numru ta' frondi, piż xott, piż imxarrab, jew erja tal-frondi, matul il-perjodu tal-ittestjar.

Rata ta' tkabbir (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija z-zieda logaritmika fil-bijomassa matul il-perjodu ta' espożizzjoni.

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' naqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir ($b'p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'hin ta' espożizzjoni partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni shiha dwar kif intgħazlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Varjabbli ta' kejl huma kwalunkwe tip ta' varjabbli li jitkejlu biex jiġi espress il-punt ta' tmien tal-ittestjar permezz ta' varjabbli ta' rispons differenti wiehed jew iktar. F'dan il-metodu, in-numru ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk u l-piż xott huma varjabbli ta' kejl.

Monokultura hija kultura bi speċi ta' pjanta wahda.

Nekrozi huwa tessut ta' frond mejjet (jiġifieri abjad jew imxarrab fl-ilma).

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taht l-LOEC.

Fenotip huma l-karatteristiċi osservabbli ta' organiżmu ddeterminati mill-interazzjoni tal-ġeni tiegħu mal-ambjent tiegħu.

Il-varjabbli ta' rispons huma varjabbli għall-istima tat-tossicità derivati minn kwalunkwe parametru mkejjet li jiddeskrivi l-bijomassa minn metodi differenti ta' kalkolu. Għal dan il-Metodu ta' Ttestjar, ir-rati ta' tkabbir u r-rendiment huma varjabbli ta' rispons derivati mill-varjabbli ta' kejl bħan-numru ta' frondi, l-erja tal-frondi, il-piż frisk jew il-piż xott.

▼ M6

Test semistatiku (tiġdid) huwa test fejn is-soluzzjoni tat-test tiġi sostitwita perjodikament f'intervalli speċifiċi matul it-test.

Test statiku huwa metodu ta' ttestjar mingħajr tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

Sustanza kimika tat-test hija sustanza jew taħlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

Punt ta' tmiem tat-test jiddeskrivi l-fattur ġenerali li sejjer jinbidel b'mod relattiv għall-kontroll mis-sustanza kimika tat-test bħala mira tat-test. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-punt ta' tmiem tal-ittestjar hija l-inibizzjoni li tista' tiġi espressa b'varjabbli ta' rispons differenti li huma bbażati fuq varjabbli ta' kejl wiehed jew iktar.

Midjum tat-test huwa midjum ta' tkabbir sintetiku komplut li fuqu jikbru l-pjanti tal-ittestjar meta esposti għas-sustanza kimika tat-test. Is-sustanza kimika tat-test sejra tinhall fil-midjum tat-test.

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex tiġi espressa l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni.

▼ M6

Appendiċi 2

Deskrizzjoni ta' *Lemna* spp.

Il-pjanta akkwatika, li komunement tissejjaħ duckweed, *Lemna* spp., tagħmel parti mill-familja Lemnaceae li għandha numru ta' speċijiet mad-dinja kollha f'erba' ġeneri. Id-dehra u t-tassonomija differenti tagħhom ġew deskritti b'mod eżawrjenti (1)(2). *Lemna gibba* u *L. minor* huma speċijiet rappreżentattivi ta' erjas b'temperatura moderata u huma komunement użati għal testijiet ta' tossiċità. Iz-żewġ speċijiet għandhom ferġha (frond) diskoidi li żżomm ril-wieċ jew mgħaddsa u għerq irqiġ hafna hiereġ miċ-ċentru tal-wieċ ta' isfel ta' kull frond. *Lemna* spp. rarament jipproduċu fjuri u l-pjanti jirriproduċu billi veġetattivament jipproduċu frondi godda (3). Meta mqabbla ma' pjanti li għandhom iktar żmien, iż-żgħar għandhom tendenza li jkunu iktar ċari, ikollhom għeruq iqsar u jikkonsistu minn tnejn sa tliet frondi b'qisien differenti. Id-daqs żgħir tal-*Lemna*, l-istruttura sempliċi, ir-riproduzzjoni asseswali u l-hin ta' ġenerazzjoni qasir tagħha jagħmlu l-pjanti ta' dan il-ġeneru adattati hafna għall-ittestjar fil-laboratorju (4)(5).

Minhabba l-varjazzjoni probabbli bejn l-ispeċijiet fis-sensittività, huma validi biss paraguni ta' sensittività fi ħdan speċi.

Eżempji ta' speċijiet ta' *Lemna* li ntużaw għall-ittestjar: Referenza għall-Ispeċijiet

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major : Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Sources of *Lemna* species

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax: +1-416-978-5878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca

▼ **M6**

North Carolina State University
 Forestry Dept
 Duckweed Culture Collection
 Campus Box 8002
 Raleigh, NC 27695-8002
 United States
 phone 001 (919) 515-7572
 astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
 SE-106 91
 STOCKHOLM
 SWEDEN
 Tel: +46 8 674 7240
 Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
 FG III 3.4
 Schichauweg 58
 12307 Berlin
 Germany
 e-mail: lemna@uba.de

LETTERATURA

- (1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review*, 27:221-287.
- (2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
- (3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
- (4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution, Ser B*, 11:1-14.
- (5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research*, 52:7-22.

▼ **M6***Appendiċi 3***Żamma tal-kultura ewlenija**

Koltivazzjonijiet ikkonċentrati jistgħu jiġu miżmuma f'temperaturi iktar baxxi (4-10 °C) għal żmien itwal mingħajr il-bżonn li jergħu jsiru mill-ġdid. Il-midjum ta' tkabbir ta' *Lemna* jista' jkun l-istess bħal dak għall-ittestjar iżda jistgħu jintużaw midjums rikki fin-nutrijenti oħra għall-kulturi ewlenin.

Perjodikament, numru ta' pjanti hodor ċari, żgħar jitpoġġew f'kontenituri tal-kultura li fihom midjum ġdid permezz ta' teknika aseptika. Fil-kundizzjonijiet iktar keshin issuġġeriti hawnhekk, jistgħu jitwettqu sottokulturi f'intervalli sa tliet xhur.

Għandhom jintużaw reċipjenti tal-kulturi tal-ħġieġ kimikament nodfa (maħsula bl-aċidu) u sterilizzati kif ukoll tekniki ta' mmanigġar aseptiċi. Fil-każ ta' kontaminazzjoni tal-kultura ewlenija, eż. b'algi jew fungi, huma meħtieġa passi biex jiġu eliminati l-organizmi kontaminanti. Fil-każ ta' algi u l-biċċa l-kbira ta' organiżmi kontaminanti oħra, dan jista' jintlaħaq bl-isterilizzazzjoni tal-wiċċ. Jittiehed kampjun tal-materjal tal-pjanta kkontaminat u l-għeruq jinqatgħu. Il-materjal imbagħad jithawwad bis-saħħa f'ilma nadif, segwit minn immersjoni f'soluzzjoni ta' 0,5 % (v/v) ipoklorit tas-sodju għal bejn 30 sekonda u 5 minuti. Imbagħad il-materjal tal-pjanta jittlaħħ b'ilma sterili u jiġi ttrasferit, bħala numru ta' lottijiet, f'reċipjenti ta' kulturi li fihom midjum tat-tkabbir frisk. Hafna mill-frondi sejrini imutu bħala riżultat ta' dan it-trattament, speċjalment jekk jintużaw perjodi ta' espożizzjoni itwal, iżda xi wħud minn dawk li jibqgħu hajjin generalment sejrini ikunu hiesla mill-kontaminazzjoni. Imbagħad dawn jistgħu jintużaw biex jergħu jinokulaw kulturi godda.

▼ M6

Appendiċi 4

Midjums

Huma rakkomandati midjums ta' tkabbir differenti għal *L. minor* u *L. gibba*. Għal *L. minor*, huwa rakkomandat midjum ta' Standard Svediż (SIS) immodifikat filwaqt li għal *L. gibba*, huwa rakkomandat midjum 20X AAP. Il-kompożizzjonijiet taż-żewġ midjums jingħataw hawn taht. Meta jiġu ppreparati dawn il-midjums, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi ta' reagent jew grad analitiku u ilma dejonizzat.

Midjum ta' tkabbir *Lemna* ta' Standard Svediż (SIS)

- Soluzzjonijiet ikkonċentrati I — V huma sterilizzati b'awtoklavazzjoni (120 °C, 15-il minuta) jew b'tisfija minn membrana (b'daq tal-pori ta' ċirka 0,2 µm).
- L-Istokk VI (u b'mod fakultattiv VII) jiġu sterilizzati bil-filtrazzjoni tal-membrana biss; dawn ma għandhiex issirilhom awtoklavazzjoni.
- Soluzzjonijiet ewlenin sterilizzati għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet friski u fid-dlam. L-Istokkijiet I — V għandhom jintremew wara sitt xhur filwaqt li l-istokkijiet VI (u b'mod fakultattiv VII) għandhom zmien tal-ħżin ta' xahar.

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/l)	Konċentrazzjoni f'midjums imhejjija (mg•l)	Midjum imhejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg•l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (bafer)	490	490	—	—

Biex thejji litru ta' midjum SIS, dan li ġej jizdied ma' 900 ml ta' ilma dejonizzat:

▼ **M6**

- 10 ml ta' soluzzjoni ewlenija I
- 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija II
- 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija III
- 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija IV
- 1 ml ta' soluzzjoni ewlenija V
- 5 ml ta' soluzzjoni ewlenija VI
- 1 ml ta' soluzzjoni ewlenija VII (fakultattiva)

Nota: Soluzzjoni ewlenija ohra VII (buffer MOPS) jaf tkun mehtieġa għal ċerti sustanzi kimiċi tat-test (ara l-paragrafu 11).

Il-pH huwa aġġustat għal $6,5 \pm 0,2$ b'0,1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustat għal litru b'ilma dejonizzat.

Midjum ta' tkabbir 20X AAP

Soluzzjonijiet ewlenin jiġu ppreparati f'ilma distillat jew dejonizzat sterilizzat.

Soluzzjonijiet ewlenin sterilizzati għandhom jinhażnu f'kundizzjonijiet friski u fid-dlam. F'dawn il-kundizzjonijiet, is-soluzzjonijiet ewlenin se jrin ikollhom żmien tal-ħżin ta' mill-anqas 6 — 8 ġimgħat.

Jiġu ppreparati hames soluzzjonijiet ewlenin tan-nutrijenti (A1, A2, A3, B u C) għal midjum 20X — AAP, permezz ta' sustanzi kimiċi tal-grad tar-reagenti. L-20 ml ta' kull soluzzjoni ewlenija tan-nutrijenti jiżdied ma' madwar 850 ml ta' ilma dejonizzat biex jiġi prodott il-midjum tat-tkabbir. Il-pH huwa aġġustat għal $7,5 \pm 0,1$ b'0,1 jew 1 mol HCl jew NaOH, u l-volum aġġustat għal litru b'ilma dejonizzat. Il-midjum imbagħad jiġi ffiltrat permezz ta' (madwar) 0,2 µm tal-filtru tal-membrani f'kontenitur sterilizzat.

Il-midjum tat-tkabbir maħsub għall-ittestjar għandu jiġi ppreparat 1-2 jum qabel l-użu biex iħalli lill-pH jistabbilizza. Il-pH tal-midjum tat-tkabbir għandu jiġi ċekkjat qabel l-użu u jerga' jiġi aġġustat biż-żieda ta' 0,1 jew 1 mol NaOH jew HCl kif deskritt hawn fuq.

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Koncentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/l) (*)	Koncentrazzjoni f'midjum ippreparat (mg/l)	Midjum imhejji	
				Element	Koncentrazzjoni (mg/l) (*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na;N	190;84
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,4	30	K;P	9,4;3,7
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66

▼ **M6**

Soluzzjoni ewlenija Nru	Sustanza	Konċentrazzjoni fis-soluzzjoni ewlenija (g/l) (*)	Konċentrazzjoni f'midjum ippreparat (mg/l)	Midjum imhejji	
				Element	Konċentrazzjoni (mg/l) (*)
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na;C	220; 43

(*) Sakemm mhux innotat

Nota: Il-konċentrazzjoni finali teoretikament xierqa tal-bikarbonat (li tevita aġġustament apprezzabbli tal-pH) hija mhux 300 mg/L. Madankollu, l-użu storiku ta' midjum 20X-AAP, inkluż ir- ring test għal din il-linja gwida, huwa bbażat fuq 300 mg/L. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.)

Midjum STEINBERG (Wara l-ISO 20079)

Konċentrazzjoni u soluzzjonijiet ewlenin

Il-midjum Steinberg immodifikat jintuża f'ISO 20079 għal *Lemna* minuri wahdu (peress li hemm *Lemna minor* biss huwa permess) iżda t-testijiet urew li jistgħu jintlaħqu riżultati tajba b'*Lemna gibba* wkoll.

Meta tipprepara l-midjum, għandhom jintużaw reagent jew sustanzi kimiċi tal-grad analitiku u ilma dejonizzat.

Ipprepara l-midjum tal-nutrijenti mis-soluzzjonijiet ewlenin k jew il-midjum ikkonċentrat ta' 10 darbiet il-konċentrazzjoni massima tal-midjum mingħajr preċipitazzjoni.

Tabella 1

Midjum STEINBERG stabbilizzat bil-pH (immodifikat skont Altenburger)

Komponent		Midjum tan-nutrijent	
Makroelementi	piż mol	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

▼ **M6**

Komponent		Midjum tan-nutrijent	
Mikroelementi	piż mol	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA Disodju-diidrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabella 2

Soluzzjonijiet ewlenin (Makroelementi)

1. Makroelementi (ikkonċentrati għal 50 darba)	g/l
Soluzzjoni ewlenija 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Soluzzjoni ewlenija 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Soluzzjoni ewlenija 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabella 3

Soluzzjonijiet ewlenin (Mikroelementi)

2. Mikroelementi (ikkonċentrati għal 1 000 darba)	mg/l
Soluzzjoni ewlenija 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Soluzzjoni ewlenija 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Soluzzjoni ewlenija 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
Soluzzjoni ewlenija 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Soluzzjoni ewlenija 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA Disodju-diidrat	1 500,00

— Is-soluzzjonijiet ewlenin 2 u 3 u b'mod separat 4 sa 7 jiistgħu jiġu raggruppati (filwaqt li jitqiesu l-koncentrazzjonijiet mehtieġa).

▼ M6

- Għal żmien tal-ħżin itwal ittratta s-soluzzjonijiet ewlenin f'awtoklava f'121 °C għal 20 minuta jew inkella wettaq filtrazzjoni sterilizzata (0,2 µm). Għas-soluzzjoni ewlenija 8 hija rakkomandata hafna filtrazzjoni sterili (0,2 µm).

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni finali tal-midjum STEINBERG (immodifikat)

- Żid 20 ml ta' soluzzjonijiet ewlenin 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' madwar 900 ml ta' ilma dejonizzat biex tevita preċipitazzjoni.
- Żid 1,0 ml ta' soluzzjonijiet ewlenin 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3).
- Il-pH għandu jkun 5,5 +/- 0,2 (aġġusta b'żieda ta' volum minimizzat ta' soluzzjoni NaOH jew HCl).
- Aġġusta bl-ilma għal 1 000 ml.

- Jekk is-soluzzjonijiet ewlenin huma sterlizzati u jintuża ilma xieraq, ma tkun meħtieġa ebda sterilizzazzjoni ulterjuri. Jekk l-isterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, wara l-awtoklavazzjoni għandha tiżdied is-soluzzjoni ewlenija 8 (f'121 °C għal 20 min).

Il-preparazzjoni ta' midjum STEINBERG b'konċentrazzjoni ta' 10 darbiet (immodifikat) għal ħżin intermedju

- Żid 20 ml soluzzjonijiet ewlenin 1, 2 u 3 (ara t-tabella 2) ma' madwar 30 ml ta' ilma biex tevita preċipitazzjoni.
- Żid 1,0 ml soluzzjonijiet ewlenin 4, 5, 6, 7 u 8 (ara t-tabella 3). Aġġusta bl-ilma għal 100 ml.
- Jekk is-soluzzjonijiet ewlenin huma sterlizzati u jintuża ilma xieraq, ma tkun meħtieġa ebda sterilizzazzjoni ulterjuri. Jekk l-isterilizzazzjoni ssir bil-midjum finali, wara l-awtoklavazzjoni għandha tiżdied is-soluzzjoni ewlenija 8 (f'121 °C għal 20 min).
- Il-pH tal-midjum (konċentrazzjoni finali) għandha tkun $5,5 \pm 0,2$.

▼ M4

C.27. TEST TAT-TOSSICITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA
BL-UŻU TA' SEDIMENT IMHALLAT

DAHLA

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 helu *Chironomus* sp. Huwa bbażat fuq protokoll iżis-tenti tat-test tat-tossicità 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). Jistghu 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-ghazla 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 tinvolve sediment fortifikat ta' sistema ta' ttestjar ta' sediment-ilma.
3. Sustanzi li jehtigilhom 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 jistghu 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-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika konċernata. Għal sustanzi li jassorbixxu hafna (eż. $b'log K_{ow} > 5$) jew għal sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-iġestjoni ta' ikel kontaminat tista' tkun rotta sinifikanti ta' espożizzjoni. Biex it-tossicità ta' sustanzi lipofiliċi hafna ma tkunx sottovalutata, jista' jitqies l-użu ta' ikel miżjud mas-sediment qabel l-applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar. Biex jittiehdu 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 mistharrġa l-effetti ta' kimika instabbli, replikati addizzjonali jistghu jitnehhew wara perjodu ta' għaxart ijiem.
4. Il-punti ta' tmiem imkejla huma l-ghadd totali ta' adulti li jkunu evolwew u ż-żmien li jkunu hađu biex evolwew. Huwa rrakkomandat li l-kejl tas-sopravivenza u tat-tkabbir tal-larvi għandu jsir biss wara perjodu ta' għaxart ijiem jekk tkun meħtieġa dejta addizzjonali 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 tinnaqqas minhabba li jiffirma "matriċi standardizzata" riprodubbli u l-htieġa li jinstabu sorsi ta' sediment mhux kontaminati u nodfa tkun eliminata;
 - it-testijiet jistghu jibdwew f'kull żmien mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġonali fis-sediment tat-test u ma jkunx hemm htieġa li s-sediment ikun ittrattat minn qabel biex titneħħa fawna indigena; l-użu ta' sediment formulat inaqqas ukoll l-ispiza b'rabta mal-gabra mill-post ta' ammonti suffiċjenti ta' sediment għal testijiet ta' rutina;
 - l-użu ta' sediment formulat jippermetti li jsiru tqabbiliet ta' tossicità u gradazzjoni ta' sustanzi b'dan il-mod.
6. Definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

▼M4

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 mehtieg (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. EC₁₅, EC₅₀ eċċ.), jew billi jintuża ttestjar ta' ipoteżi ta' statistika biex ikun iddeterminat NOEC/LOEC. Dan tal-aħhar ikun jehtieglu tqabbil ta' valuri ta' effett ma' valuri ta' kontroll billi jintużaw testijiet ta' statistika.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA GHALL-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, pentaklorur fenol, 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 ssehh bejn 12 u 23 jum wara li jkunu ddaħħlu fir-reċipjenti; għal C. tentans, ikun mehtieg perjodu ta' 20 sa 65 jum.
- fit-tmiem tat-test, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossigenu maħlul għandhom jitkejlu f'kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossigenu 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 $\pm 1,0$ C. It-temperatura tal-ilma tista' tkun ikkontrollata b'kamra iżotermika u f'dak il-każ it-temperatura tal-kamra għandha tkun ikkonfermata f'interval xieraq ta' hin.

▼ M4

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Reċipjenti tat-test

11. L-istudju jitwettaq f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru qies ta' 8 cm. Reċipjenti oħra jkunu tajbin, iżda għandhom jiggarantixxu fond sewwa tal-ilma ta' fuq u tas-sediment. Il-wiċċ tas-sediment għandu jkun suffiċjenti biex jipprovi 2 sa 3 cm² 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 iehor li jiġu f'kontatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kollha mill-ħġieġ jew minn materjal iehor kimikament inert (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 jehtigilha 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 yohimatsui* (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 (msejjah ukoll sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Iżda, jekk jintuża sediment naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (huma wkoll irrakkomandati mill-anqas pH, kontenut ta' karbonju organiku, determinazzjoni ta' parametri oħra bħal proporzjon ta' C/N u granulometrija), u għandu jkun hieles minn kull kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu ma', jew jikkunsmaw lill-kironomidi. Huwa wkoll irrakkomandat li, qabel ma jintuża f'test tat-tossicità tal-kironomidi, is-sediment naturali jkun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taht 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 (particelli 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-particelli bejn 50 u 200 µm).
- (d) Jiżdied ilma dejonizzat biex jinkiseb kontenut ta' rtuba tat-tahlita finali f'firxa ta' 30-50 %.
- (e) Jiżdied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura (CaCO₃) biex ikun aġġustat il-pH tat-tahlita finali tas-sediment għal 7,0 ± 0,5. Il-kontenut ta' karbonju organiku tat-tahlita 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-thejjja tas-sediment formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-tahlit ta' kostitwenti nixfin ikun ukoll aċċettabbli jekk jintwera li wara li jkun żdied l-ilma ta' fuq ma sseħhx separazzjoni tal-kostitwenti tas-sediment (eż. biċċiet tal-pit fil-wiċċ tal-ilma), u li l-pit jew is-sediment ikunu kkondizzjonati b'mod suffiċjenti.

▼ M4

Ilma

15. Kull ilma li jkun konformi mal-karatteristiċi kimiċi ta' ilma dilwit b'mod aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 ikun tajjeb bħala ilma tat-test. Kull ilma tajjeb, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taħt l-art), ilma rikositwit (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' melh minerali fl-ilma ma jkunx oghla minn 400 mg/l bħala CaCO_3 . Izda, jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-mel minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melh 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 mhalltin tal-konċentrazzjoni magħżula s-soltu jithejjew biż-żieda ta' soluzzjoni tas-sustanza għall-ittestjar direttament mas-sediment. Soluzzjoni ta' stokkijiet tas-sustanza għall-ittestjar mahlula f'ilma dejonizzat tithallat mas-sediment formulat b'mithan romblu, b'mikser tal-ghalf jew billi tithallat bl-idejn. Jekk ftit tithallat fl-ilma, is-sustanza għall-ittestjar tista' tinhall f'volum kemm jista' jkun żgħir ta' solvent organiku adatt (eż. eżanu, aċeton jew kloroform). Din is-soluzzjoni mbagħad tithallat ma' 10 g ta' ramel fin tal-quartz għal reċipjent wiehed tat-test. Is-solvent jithalla jevapora u għandu jitneħħa għal kollox mir-ramel; ir-ramel imbagħad jithallat 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-tahlita tar-ramel meta jkun qed jithejja s-sediment (jiġifieri s-sediment għandu, għalhekk, jithejja 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' omogeneità.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test jirrelata mal-ghażla tal-ghadd u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-testijiet, mal-ghadd ta' reċipjenti għal kull konċentrazzjoni u mal-ghadd 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 analizi 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 inkluzi fit-test. Generalment, 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 hafna taħt il-konċentrazzjoni pożittiva l-aktar baxxa jew 'il fuq mill-oghla konċentrazzjoni għandha tkun evitata. Test preliminari biex jinstabu firxiet ikun utli biex tintgħazel il-firxa ta' konċentrazzjonijiet li jkollhom jintużaw (ara l-paragrafu 27)).

▼M4

19. Jekk għandu jkun stmat EC_{50} , għandhom ikunu ttestjati mill-anqas hames konċentrazzjonijiet u tliet replikati għal kull konċentrazzjoni. Huwa rrakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet suffiċjenti ta' testijiet biex tithalla ssir stima tajba ta' mudell. Il-fattur bejn konċentrazzjonijiet m'għandux ikun akbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'kazijiet meta l-kurva ta' rispons għad-doża jkollha angli baxx). L-għadd ta' replikati f'kull trattament jista' jtnaqqas jekk l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti jiżdied. Iz-zieda 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 mehtieġa 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 hames 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, Analizi 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 wiehed 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 daww li jiehdu 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 mehtieġa 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-htigijiet ta' dan it-test (normalità, varjanzi omogenji). Jista' jintuża t-t-test ta' varjanza inugwali jew test mhux parametrik, bħat-test Wilcoxon-Mann-Whitney, jekk dawn il-htigijiet ma jkunux sodisfatti. Bil-proporzjon ta' evoluzzjoni, it-test eżatt ta' Fisher ikun adatt.

PROCEDURA**Kondizzjonijiet ta' espożizzjoni**

Thejija ta' sistema ta' sediment u ilma ffortifikati

22. Hija rrakkomandata l-proċedura ta' fortifikazzjoni deskritta fil-Metodu ta' Ttestjar C.8: Tossiċità għal Hniex għal applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar (14). Is-sedimenti ffortifikati jitqiegħdu fir-reċipjenti u jiżdied ilma ta' fuq biex jingieb 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 sospensjonijiet mill-ġdid ta' materjal fin matul iż-zieda ta' ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, is-sediment jista' jitgħatta b'diska tal-plastik waqt li jkun qed jittferra' ilma fiha, u d-diska titneħħa minnufih wara. Apparati oħra jistgħu wkoll ikunu adatti.
23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu mghottjin (eż. bi platti tal-ħgieg). Jekk ikun mehtieġ, matul l-istudju l-ilma jmintela sal-livell tal-volum oriġinali biex dan jagħmel tajjeb għall-evaporazzjoni tal-ilma. Dan għandu jsir billi jintuża ilma distillat jew dejonizzat biex ma jithalliex jiżdied melh.

▼ M4

Stabilizzazzjoni

24. Malli jkun thejja s-sediment iffortifikat bl-ilma ta' fuq, tkun haġa mixtieqa li tithalla ssir partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar mill-faži milwiema għas-sediment (3)(4)(6)(13). Preferibbilment dan għandu jsir skont il-kondizzjonijiet ta' temperatura u tirwiħ użati fit-test. Żmien xieraq ta' ekwilibrazzjoni huwa speċifiku għas-sediment u għall-kimika, u jista' jiehu minn sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa diversi ġimgħat (4-5 ġimgħat). Minhabba li dan iħalli żmien għal degradazzjoni ta' hafna 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'wahda aktar baxxa (ara l-paragrafu 38). Dawn id-determinazzjonijiet analitiċi tas-sustanza għall-ittestjar jippermettu ssir kalkolazzjoni tal-bilanċ tal-massa u espressjoni ta' riżultati abbażi ta' konċentrazzjonijiet imkejla.

Żieda ta' organiżmi tat-test

25. Minn erba' sa hamest ijiem qabel ma l-organiżmi tat-test jiżdiedu fir-reċipjenti tat-test, għandhom jittiehdu 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 thejja. Jekk jintuża dan tal-aħħar, ammont żgħir ta' ikel eż. alka ħadra u/jew f'it qatriet żgħar ta' filtrat minn sospensjoni mithuna fin ta' trofof ta' ikel tal-hut għandu jiżdied mal-midjum tal-kultura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss kwantitajiet ta' bajd miġbur frisk. Normalment, il-larvi jibdwu ifaqqsu f'it 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 yoshimatu* 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-faži ta' pappamoski tista' possibbilment tkun ivverifikata billi jintuża l-wisa' tal-iskutella tar-ras (6).
26. Ghoxrin larvi tal-ewwel fażi jkunu allokat i kif jinżertaw lil kull reċipjent tat-test li jkun fi h 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-ghan tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet spazjati fil-wisa' tas-sustanza għall-ittestjar. Biex tkun ipprovduta l-istess densità tal-wieċ għal kull kironomidu, li jkolli 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 hames konċentrazzjonijiet kif deskritt fil-paragrafi 18 sa 20.

▼ **M4***Kontrolli*

29. Reċipjenti ta' kontroll minghajr 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 statiči. Sistemi semistatichi jew ta' fluss kontinwu bl-ilma ta' fuq jiġgedded kull tant jew kontinwament jistgħu jintużaw f'kazijiet eċċezzjonali bħal pereżempju jekk speċifikazzjonijiet tal-kwalità tal-ilma jisfaw ma jkunux adatti għall-organizmu tat-test jew jaffettwaw l-ekwilibriju kimiku (eż. livelli ta' ossiġnu mahlul jinżlu baxxi hafna, il-konċentrazzjoni ta' prodotti ta' ekskreta toghla żżejjed jew minerali jli ssu minn sediment u jaffettwaw il-pH u/jew il-melħ minerali fl-ilma). Iżda metodi oħra biex titjeb il-kwalità tal-ilma ta' fuq, bħal tirwih, għandhom normalment ikunu biżżejjed u jkunu ppreferuti.

Ikel

31. Ikun mehtieg li l-larvi jintemgħu, preferibbilment kuljum jew mill-anqas tliet darbiet fil-gimgha. L-ikel tal-hut (sospensjoni fl-ilma jew ikel mithun 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. yoshimatus*) għal kull larva kuljum jidher li jkun adegwat għal larvi żgħar għall-ewwel 10 ijiem. Jista' jkun mehtieg 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 hafna (eż. $b'log K_{ow} > 5$), jew sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-ammont ta' ikel mehtieg biex ikunu żgurati sopravvenza u tkabbir naturali tal-organizmi jista' jiżdied mas-sediment formulat qabel il-perjodu ta' stabbilizzazzjoni. Għal dan, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok ikel tal-hut, eż. tista' tintuża zieda ta' 0,5 % (piż fin-niexef) ta' weraq mithunn fin ta' eż. horrieqa 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. Tirwih 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 mahlul ma tinzix taht 60 % ta' ASV). Tirwih ikun ipprovdut permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħgieg imwahnha 2-3 cm 'il fuq mis-saff tas-sediment (jiġifieri buzzieqa wahda jew ftit tal-ilma/sec). Meta jkunu qed jiġu ttestjati kimiċi volatili, jista' jitqies li s-sistema tas-sediment-ilma ma titrewwahx.
33. It-test jitmexxa f'temperatura kostanti ta' 20 °C (± 2 °C). Għal *C. tentans* u *C. yoshimatus* t-temperaturi rakkomandati jkunu ta' 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun 500 sa 1 000 lux.

▼ **M4***Durata tal-espożizzjoni*

34. L-espożizzjoni tibda biż-żieda ta' larvi fir-reċipjenti ffortifikati u ta' kontroll. Id-durata massima tal-espożizzjoni tkun ta' 28 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u 65 jum għal *C. tentans*. Jekk pappamoski jevolvu qabel, it-test jista' jitwaqqaf wara minimu ta' hamest ijiem wara li jkun evolva l-ewwel adult fil-kontroll.

Osservazzjonijiet*Emergenza*

35. Ikunu ddeterminati ż-żmien ta' żvilupp u l-ghadd totali ta' pappamoski rgħiel u nisa evoluti għal kollox. L-irgħiel ikunu identifikati faċilment mill-antenni tagħhom kollha pjumi.
36. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu osservati mill-anqas tliet darbiet fil-gimgha 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 evolwew għalkollox. Is-sess u l-ghadd ta' pappamoski evoluti għalkollox ikunu rreġistrati kuljum. Wara identifikazzjoni l-pappamoski jitnehħew mir-reċipjenti. Kull kwantità ta' bajd iddepożitata qabel ma jintemm it-test għandha tkun irreġistrata u mbagħad titneħħa biex larvi ma jithallewx jerġghu jidhlu fis-sediment. Ikun irreġistrat ukoll l-ghadd 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 inkluzi 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 immobilità 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.

Kejljiet analitiċi*Konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar*

38. Qabel ma jibda t-test (jiġifieri żieda ta' larvi), jittiehdu kampjuni tas-sediment kollu minn mill-anqas reċipjent wiehed 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'wahda 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 jittiehdu kejljiet intermedji (eż. fis-7 jum) u jekk l-analiżi jkun jehtigilha kampjuni kbar li ma jkunux jistgħu jittiehdu 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 (inkludha l-preżenza ta' organiżmi tat-test) izda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.

▼ **M4**

40. Ċentrifugazzjoni pereżempju ta' 10 000 g u 4 °C għal 30 min. hija l-proċedura rrakkomandata biex ikun iżolat ilma interstizjali. Iżda jekk is-sustanza għall-ittestjar tkun turi li filtri ma jassorbuhix, tista' wkoll tkun aċċettabbli l-filtrazzjoni. F'xi każijiet jista' ma jkunx possibbli li jkunu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori minhabba 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). Melh minerali fl-ilma u ammonja għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wiehed tat-test fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

DEJTA U RAPPORTAR*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' sensitivitàjiet differenti statistikament ta' sessi, riżultati dwar irġiel u nisa jkunu jistgħu jingabru għal analiżi ta' statistika. Id-differenzi ta' sensitività 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-paragrafu 38).
44. Biex tkun ikkomputata stima ta' punti għall-EC₅₀ jew għal kull EC_x ohra, 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 titjeb l-omoġeneità ta' varjanza. Iżda, valuri EC_x għandhom ikunu kkalkulati wara li r-rispons ikun ġie ttrasformat u ttiehed 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 jehtigilha titqies, eż. b'ANOVA f'aktar stadji. Alternattivament, aktar testijiet robusti (21) jistgħu jkunu adatti f'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet tas-soltu ta' ANOVA.

Proporzjon ta' evoluzzjoni

46. Proporzjonijiet ta' evoluzzjoni huma dejta alternattiva mhux kontinwa, u jistgħu jkunu analizzati bit-test ta' Cochran-Armitage applikat b'mod devoluttiv fejn tkun mistennija doża-rispons monotonika u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-istennija. Jekk le, jistgħu jintużaw test eżatt ta' Fisher jew dak ta' Mantel-Haenszel b'valuri "p" ta' Bonferroni-Holm aġġustati. Jekk ikun hemm evidenza ta' varjabbiltà akbar bejn replikati fl-istess konċentrazzjoni milli distribuzzjoni binomja tkun tindika (sikwit irriferuta bħala varjazzjoni "extrabinomja"), mbagħad għandhom jintużaw test robust ta' Cochran-Armitage jew dak eżatt ta' Fisher kif propost fi (21).

▼ **M4**

L-ghadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent, ne, ikun iddeterminat u diviż bl-ghadd 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 Dunnnett ikun adatt fejn il-monotonicità ma tapplikax. Daqs kbir ta' kampjun huwa ddefinit hawn bħala l-ghadd evolut, u l-ghadd mhux evolut ukoll ikun aktar minn hamsa, 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 uguali. 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 jittiehed l-inverse sine ($\sin^{-1}$) tal-għerq kwadrat ta' ER.

49. Għal proporzjonijiet ta' evoluzzjoni, valuri EC_x ikunu kkalkulati billi tintuża analizi ta' rigressjoni (jew eż. probit (22), logit, Weibull, softwer kummerċjali adatt, eċċ.). Jekk analizi ta' rigressjoni tfalli (eż. meta jkun hemm anqas minn żewġ risponsi parzjali), jintużaw metodi mhux paramettriċi oħra bħal medja mobbli jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata ta' żvilupp

50. Il-hin medju ta' żvilupp jirrappreżenta t-tul medju ta' żmien bejn id-dhul 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-dhul). Ir-rata ta' żvilupp hija r-reċiproka taż-żmien tal-iżvilupp (unità: 1/jum) u tirrappreżenta dik il-parti tal-iżvilupp tal-larva li ssehh kuljum. Ir-rata ta' żvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar tossiċità ta' sediment minhabba li l-varjanza tagħha hija aktar baxxa, u hija aktar omogenja u egreb distribuzzjoni normali kif imqabbla ma' żmien ta' żvilupp. Għalhekk, jistgħu jintużaw proċeduri ta' test parametruku 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 analizi ta' rigressjoni (eż. (23), (24)).

51. Għat-testijiet ta' statistika li ġejjin, l-ghadd ta' pappamoski osservati f'jum ta' spezzjoni x ikunu preżunti li jkunu evolwew fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn jum x u jum $x-1$ (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, is-soltu jum 1). Ir-rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent ($\bar{x}$) tkun ikkalkulata skont:

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

▼ **M4**

fejn:

$\bar{x}$: rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent

i : indiċi ta' intervall ta' spezzjoni

m : għadd massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

f_i : għadd ta' pappamoski evoluti fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e : għadd totali ta' pappamoski evoluti fit-tmiem tal-esperiment ($= \sum f_i$)

x_i : rata ta' żvilupp tal-pappamoski evoluti f'intervall i

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

fejn:

day_i : jum ta' spezzjoni (jiem minhabba applikazzjoni)

l_i : tul ta' intervall ta' spezzjoni i (jiem, is-soltu jum wiehed)

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, koefċjent tal-partizzjoni fil-hamrija (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 ddahhlu fir-reċipjenti tat-test.

Kondizzjonijiet tat-test:

- sediment użat, jiġifieri sediment naturali jew formulat;
- għal sediment naturali, post u deskrizzjoni ta' sit ta' tehid ta' kampjuni ta' sediment, inkluża, jekk ikun possibbli, storja ta' kontaminazzjoni; karatteristiċi: pH, kontenut ta' karbonju organiku, proporzjon ta' C/N u granulometrija (skont kif jixraq).
- thejġija tas-sediment formulat: ingredjenti u karatteristiċi (kontenut ta' karbonju organiku, pH, rtubija, eċċ. fil-bidu tat-test);
- thejġija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (koncentrazzjoni tal-ossigenu, pH, konduttività, melh 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 minghajr ilma tal-pori;

▼ **M4**

- reċipjenti tat-test (materjal u daqs);
- metodu ta' fortifikazzjoni ta' sediment: konċentrazzjonijiet ta' testijiet użati, għadd ta' replikati u użu ta' solvent jekk ikun hemm;
- fażi ta' ekwilibriju ta' stabbilizzazzjoni tas-sistema ta' sediment-ilma fortifikata: durata u kondizzjonijiet;
- kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni: temperatura, ċiklu ta' dawl u intensità, tirwih (frekwenza u intensità);
- informazzjoni dettaljata dwar għalf inkluż tip ta' ikel, thejjija, 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 mahlul, melh minerali fl-ilma u ammonja;
- bdil ta' ilma evaporat tat-test, jekk ikun hemm;
- għadd ta' pappamoski evoluti rgħiel 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 rgħiel u nisa miġburin flimkien);
- rata medja ta' żvilupp ta' pappamoski żviluppati għalkollox għal kull replika u rata ta' trattament (pappamoski rgħiel u nisa miġburin flimkien);
- stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi eż. EC_x (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-konkluzjonijiet 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 Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼ **M4**

- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ u Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. 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 Canada (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 zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.
- (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.
- (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.
- (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.
- (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼ M4*Appendiċi 1*

DEFINIZZJONIJIET

Għall-fini ta'dan il-Metodu ta' Ttestjar jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sediment ifformulat jew sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku, huwa tahlita 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 jikkupa l-ispazju bejn sediment u partikkel tal-hamrija.

Sediment fortifikat huwa sediment li miegħu tkun żdiedet sustanza għall-ittestjar.

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

▼ **M4***Appendiċi 2***Rakkomandazzjonijiet għal kultura ta' *Chironomus riparius***

1. Larvi ta' *Chironomus* jistgħu jtkabbru 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-qiegh tal-kontenitur. Kieselguhr (eż. Merck, Art 8117) ukoll intwera li huwa substrat adatt (saff irqaq ta' sa ftit hafna mm ikun biżżejjed). Wara jiżdied ilma adattat għal fond ta' diversi cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jmtlew kull meta huwa mehtieg biex jieħdu post it-telf li jirriżulta mill-evaporazzjoni, u jkun ta' repevenzjoni kontra d-dessekazzjoni. L-ilma jista' jinbidel jekk ikun mehtieg. Għandu jkun ipprovdut tirwih bil-mod. Ir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi għandhom jinżammu f'gagġa apposta li ma thallix li l-adulti li jkunu qed jevolvu jaharbu. Il-gagġa għandha tkun kbira biżżejjed biex adulti evoluti ma jithallewx jimirhu fi qtajja kbar, għax inkella tista' ma ssirx kopulazzjoni (il-minimu huwa ta' madwar 30 x 30 x 30 cm).
2. Gagġe 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' tfixx ir-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuza kull ilma tajjeb naturali jew sintetiku. Komunement jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit li jkun tneħhielu l-kloru u midja artifiċjali (eż. il-midjum Elendt "M4" jew "M7", ara hawn taht). L-ilma għandu jitrewwah qabel ma jintuza. Jekk ikun mehtieg, l-ilma tal-kultura jista' jigġedded billi l-ilma użat jitferra' jew jgħaddi minn go sifun minn reċipjenti ta' kultura b'attenzjoni mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larvi.

Tmigh tal-larvi

4. Larvi ta' *Chironomus* għandhom jintemgħu ikel ta' trofof tal-hut (TetraMin[®], TetraPhyll[®] jew marka simili oħra ta' ikel tal-hut proprjetarju), f'bejn wieħed u iehor 250 mg għal kull reċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bhala trab mithun niexef jew bhala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ta' ikel ta' trofof jiżdied ma' 20 ml ta' ilma ta' dilwizzjoni u jithallat biex jagħti tahlita omogena. Din it-tnejja tista' tintema' f'rata ta' madwar 5 ml għal kull reċipjent kuljum (ixxejkja qabel ma tuża). Larvi li jkollhom aktar zmien jistgħu jirċievu aktar.
5. It-tmigh jista' jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum ta' kultura "jissahhab", it-tmigh għandu jitnaqqas. Żidiet ta' ikel għandhom ikunu mmonitorjati b'attenzjoni. Ikel mill-anqas jikkawża tluq tal-larvi lejn il-kolonna tal-ilma, u hafna ikel jikkawża aktar attività mikrobika u konċentrazzjonijiet tal-ossigenu mnaqqsin. Iz-żewġ kondizzjonijiet jistgħu jgħibu 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.

Tmigh ta' adulti evoluti

7. Xi whud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mghaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

▼ M4**Emergenza**

8. F'20 + 2 °C adulti jibdew jevolvu mir-reċipjenti għat-tkabbir tal-larvi wara bejn wiehied u iehor 13 - 15-il jum. L-irġiel jintgħarf malajr għax ikollhom antenni kollha pjumi.

Kwantitajiet ta' bajd

9. Malli l-adulti jkunu fil-gagġa tat-trobbija, ir-reċipjenti kollha għat-tkabbir tal-larvi għandhom ikunu eżaminati tliet darbiet fil-gimgha għal tqeghid ta' kwantitajiet ta' bajd qisu ġelatina. Jekk ikun hemm, il-kwantitajiet ta' bajd għandhom jitnehhew 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-tossicità.

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 gimgha jew anqas ta' spiss skont htigijiet ta' ttestjar, billi jitnehhew ir-reċipjenti aktar qodma wara li jkunu evolwew pappamoski adulti. Bl-użu ta' din is-sistema jkun hemm provvista regolari ta' adulti b'anqas manigġar.

Thejjija ta' soluzzjonijiet tat-testijiet "M4" and "M7"

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midjum "M4". Il-midjum "M7" jithejja bhala l-midjum "M4" hlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom konċentrazzjonijiet ikunu erba' darbiet aktar baxxi f'"M7" milli f'"M4". Qed tithejja 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 H₂O, NaNO₃, KH₂PO₄ u K₂HPO₄ mogħtija għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet stokk mhumiex adegwati.

Thejjija tal-midjum "M7"

13. Kull soluzzjoni ta' stokkijiet (I) tithejja wahda wahda u soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) tithejja minn dawn is-soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) (ara Tabella 1). Hamsin 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 jithejja l-midjum "M7". Tithejja soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini billi jizdiedu tliet vitamini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u jizdied 0,1 ml tas-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien ta' vitamini mal-midjum "M7" finali fit qabel ma jintuza. (Is-soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini tinhażen iffrizata f'alikwoti żgħar). Il-midjum jitrewwah u jkun stabbilizzat.

LETTERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼ **M4**

Tabella 1

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet ta' mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex thejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): hallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u aghmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Koncentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ ⁽¹⁾	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl ₂ · 4 H ₂ O ⁽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 · 6 H ₂ O ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2 H ₂ O ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7 H ₂ O ⁽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 taht.

⁽²⁾ Dawn is-soluzzjonijiet jithejjew wahda wahda, mbagħad jitferrghu 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 jithejja midjum M4 and M7 (ml/l)	Koncentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Tabella 3

Soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini għall-midjum M4 u M7. It-tliet soluzzjonijiet kollha ta' vitamini jingħaqdu flimkien biex jagħmlu soluzzjoni waħda ta' stokkijiet ta' vitamini.

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma de- nizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini miżjudin biex jiġieja midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali f' soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tijamina	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

LETTERATURA

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼ **M4***Appendiċi 3***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' hażiż Sphagnum, qrib kemm jista' jkun ta' pH 5,5-6,0 minghajr ma tibqa' tidher il-pjanta, mithun 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 μ m	75 - 76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda ta' pit u ramel	2 ($\pm 0,5$)
Karbonat tal-kalċju	CaCO ₃ , pulverizzat, kemikament pur	0,05 - 0,1
Ilma	Konduttività ≤ 10 μ S/cm	30 - 50

Thejjija

Il-pit jitnixxef bl-arja u jintahan fi trab fin. Tithejja sospensjoni tal-ammont mehtieg ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat billi jintuza apparat ta' omoġeneizzazzjoni ta' prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-suspensjoni jiġi aġġustat sa $5,5 \pm 0,5$ b'CaCO₃. Is-suspensjoni tiġi kkondizzjonata għal mill-anqas jumejn billi titthawwad bil-mod f' 20 ± 2 °C, biex il-pH isir stabbli u jistabbilixxi komponent mikrobiku stabbli. Il-pH jerga' jitkejjel u għandu jkun $6,0 \pm 0,5$. Mbagħad is-suspensjoni tal-pit titthallat 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-tahlita finali jerga' jitkejjel għal darb'ohra u jiġi aġġustat għal 6,5 sa 7,5 b'CaCO₃ jekk ikun mehtieg. Jittiehdu kampjuni tas-sediment biex ikun iddeterminat il-piż fin-niexef u l-kontenut ta' karbonju organiku. Mbagħad, qabel ma jintuza fit-test tat-tossicità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li s-sediment formulat ikun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taht l-istess kondizzjonijiet li jkun hemm fit-test sussegwenti.

Hżin

Il-kostitwenti nixfin għat-thejjija tas-sediment artifiċjali jistgħu jinhażnu f'post niexef u frisk f'temperatura ambjentali. Is-sediment formulat (mxarrab) m'għandux jinhażen qabel ma jsir użu minnu fit-test. Għandu jintuza minnufih wara l-perjodu ta' kondizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-thejjija tiegħu.

LETTERATURA:

Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness. Tossicità għal Hniex.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

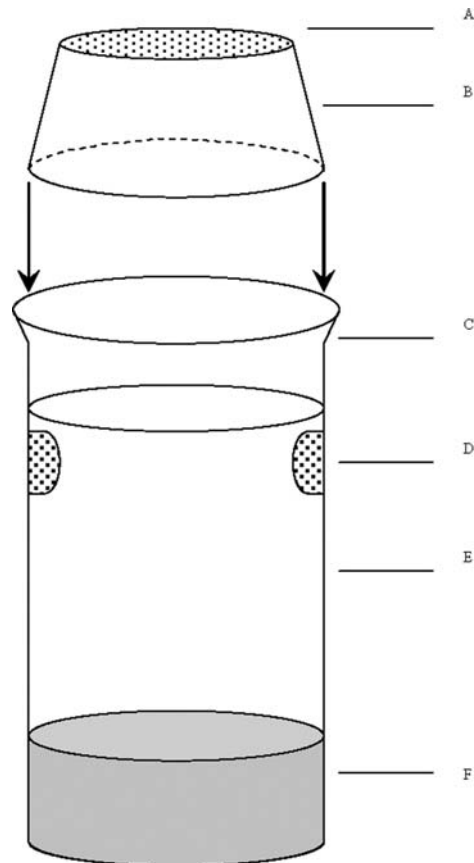
▼ **M4***Appendiċi 4***Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli**

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

(*) Izda għandu jkun innotat li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni).

▼ **M4***Appendiċi 5***Gwida għall-monitoraġġ tal-evoluzzjoni ta' larvi kironomidi**

Sifuni ta' evoluzzjoni jitqiegħdu fuq il-bekkijiet tat-test. Dawn is-sifuni jkunu meħtieġa mill-20 jum sa meta jintemm it-test. Eżempju ta' sifun li jintuża huwa pingūt hawn taħt:



A: l-iskrijn tan-nylon

D: il-portijiet tal-iskrijn li jibdlu l-ilma

B: il-kikkri tal-plastik maqluba

E: ilma

C: il-bekk ta' espożizzjoni mingħajr xoffa

F: sediment

▼ M4

C.28. TEST TAT-TOSSICITÀ TA' KIRONOMIDI TA' SEDIMENT-ILMA
BL-UŻU TA' ILMA FORTIFIKAT

DAHLA

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 helu *Chironomus* sp. Huwa primarjament ibbażat fuq il-linja gwida BBA li tuża sistema tat-test sediment-ilma bil-hamrija artifiċjali, u x-xenarju ta' espożizzjoni tal-kolonna tal-ilma (1). Iqis ukoll protokollu eżistenti ta' testijiet tat-tossicità 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 ohra 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 jilhq u l-aqwa tagħhom f'ilma tal-pori. Huwa wkoll utli għal tipi ohra ta' espożizzjoni (inkluż tixrid kimiku) hlief għal proċessi ta' akkumulazzjoni li jdumu aktar mill-perjodu tat-test.
3. Sustanzi li jehtigilhom 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 mehud għal kull waħda biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi mill-proprietajiet fiżikokimiċi tal-kimika konċernata. Għal sustanzi li jassorbixxu hafna (eż. $b'log K_{ow} > 5$) jew għal sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-ingestjoni ta' ikel kontaminat tista' tkun rotta sinifikanti ta' espożizzjoni. Biex it-tossicità ta' sustanzi lipofiliċi hafna ma tkunx sottovalutata, jista' jitqies l-użu ta' ikel miżjud mas-sediment qabel l-applikazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar. Biex jittiehdu 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 mistharra l-effetti ta' kimiċi instabbli, replikati addizzjonali jistgħu jitnehhew 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 hađu 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 addizzjonali 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 minhabba li jifforma "matrici standardizzata" riproduttiva u l-htieġa li jinstabu sorsi ta' sediment mhux kontaminati u nodfa tkun eliminata;
 - it-testijiet jistgħu jibdwu f'kull żmien mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà staġonali fis-sediment tat-test u ma jkunx hemm htieġa li s-sediment ikun ittrattat minn qabel biex titneħħa fauna indigena; l-użu ta' sediment formulat inaqqas ukoll l-ispiza b'rabta mal-gabra mill-post ta' ammonti suffiċjenti ta' sediment għal testijiet ta' rutina;

▼ M4

- l-użu ta' sediment formulat jippermetti li jsiru tqabbiliet ta' tossiċità u gradazzjoni ta' sustanzi b'dan il-mod: dejta dwar tossiċità minn testijiet b'sediment naturali u artifiċjali kienet komparabbli għal diversi kimiċi (2).

6. Definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel fażi ta' larvi kironomidi jkunu esposti għal firxa ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'sistemi ta' sediment-ilma. It-test jibda billi l-larvi tal-ewwel fażi jitqiegħdu fil-bekkijiet tat-test li jkun fihom is-sistema ta' sediment-ilma u sussegwentement is-sustanza għall-ittestjar tiġi ffortifikata mal-ilma. Ir-rata ta' evoluzzjoni u żvilupp ta' kironomidi titkejjel fit-tmiem tat-test. Is-sopravivenza u l-piż tal-larvi jistgħu jitkejjlu 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-aħhar ikun jeħtieġli 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-pessjoni 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 jsirihom it-test tingħata fi (12).

KIMIĊI TA' REFERENZA

9. Kimiċi ta' referenza jistgħu jkunu ttestjati perijodikament 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-kamdu 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 ssehh bejn 12 u 23 jum wara li jkunu ddahħlu fir-reċipjenti; għal *C. tentans*, ikun meħtieġ perjodu ta' 20 sa 65 jum.
- fit-tmiem tat-test, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlul għandhom jitkejjlu f'kull reċipjent. Il-konċentrazzjoni tal-ossigenu għandha tkun mill-anqas 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura użata, u l-pH tal-ilma ta' fuq għandu jkun fil-firxa ta' 6-9 fir-reċipjenti kollha tal-ittestjar;

▼ **M4**

- it-temperatura tal-ilma mhux suppost tkun differenti b'iktar minn $\pm 1,0$ °C. It-temperatura tal-ilma tista' tkun ikkontrollata b'kamra iżoteromika u f'dak il-każ it-temperatura tal-kamra għandha tkun ikkonfermata f'intervall xierqa ta' hin.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Reċipjenti tat-test**

11. L-istudju jitmexxa f'bekkijiet tal-ħgieg 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 jipprovi 2 sa 3 cm² 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 iehor li jiġu f'kontatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kollha mill-ħgieg jew minn materjal iehor kimikament inert (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 jehtigilha 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 yohimatsui* (11). L-identifikazzjoni ta' speċijiet għandha tkun ikkonfermata qabel l-ittestjar iżda ma tkunx meħtieġa qabel kull test jekk organiżmi jkunu ġejjin minn kultura interna.

Sediment

13. Preferibbilment għandu jintuża sediment formulat (msejjaħ ukoll sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Iżda, jekk jintuża sediment naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (huma wkoll irrakkomandati mill-anqas pH, kontenut ta' karbonju organiku, determinazzjoni ta' parametri oħra bħal proporzjon ta' C/N u granulometrija), u għandu jkun hieles minn kull kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu ma', jew jikkunsmaw lill-kironomidi. Huwa wkoll irrakkomandat li, qabel ma jintuża f'test tat-tossicità tal-kironomidi, is-sediment naturali jkun ikkondizzjonat għal sebat ijiem taht 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 uzata 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 (particelli 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-particelli bejn 50 u 200 μ m).
 - (d) jiżdied ilma dejonizzat biex jinkiseb kontenut ta' rtuba tat-tahlita finali f'firxa ta' 30 - 50 %.
 - (e) Karbonat tal-kalċju ta' kwalità kemikament pura (CaCO₃) jiżdied, aġġusta l-pH tat-tahlita finali tas-sediment għal $7,0 \pm 0,5$.
 - (f) Il-kontenut ta' karbonju organiku tat-tahlita finali għandu jkun 2 % ($\pm 0,5$ %) u għandu jkun aġġustat b'ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).

▼ **M4**

14. Is-sors tal-pit, tafal tal-kawlina u ramel għandha tkun magħrufa. Il-komponenti tas-sediment għandhom ikunu eżaminati għan-nuqqas ta' kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-organokloru, komposti organofosforużi, eċċ.). Eżempju għat-thejjija tas-sediment formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-tahlit ta' kostitwenti nixfin ikun ukoll aċċettabbli jekk jintwera li wara li jkun żdied l-ilma ta' fuq ma sseħħ 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' taht 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' melh minerali fl-ilma ma jkunx oghla minn 400 mg/l bħala CaCO_3 . Izda, jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melh minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melh 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 jithejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ta' stokkijiet. Soluzzjonijiet ta' stokkijiet għandhom preferibbilment jithejjew billi s-sustanza għall-ittestjar tinhall 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. $\leq 0,1$ ml/l) u għandu jkun l-istess fit-trattamenti kollha. Meta jintuża aġent ta' solubilità, m'għandux ikollu effetti sinifikanti fuq sopravivenza jew effetti ħazin viżibbli fuq il-larvi kironomidi kif ikun żvelat minn kontroll ta' solventi biss. Izda 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-ghadd u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-testijiet, mal-ghadd ta' reċipjenti għal kull konċentrazzjoni u mal-ghadd ta' larvi għal kull reċipjent. Huma deskritti disinni għal stima ta' punti ta' EC, għal stima ta' NOEC u biex jitmexxa test ta' limitu. L-analiżi b'rigrassjoni hija ppreferuta mill-approċċ ta' ttestjar ta' ipoteżi.

Disinn għal analiżi b'rigrassjoni

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 inkluzi fit-test. Generalment, l-akkuratezza u l-aktar il-validità, li bihom ikunu jistgħu jsiru stimi ta' konċentrazzjonijiet ta' effetti (EC_x), titjeb meta l-konċentrazzjoni ta' effetti tkun fil-firxa ta'

▼ M4

konċentrazzjonijiet ittestjati. Estrapolazzjoni hafna taht 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 hames konċentrazzjonijiet u tliet replikati għal kull konċentrazzjoni. Fi kwalunkwe każ, huwa rrakkomandat li jintużaw konċentrazzjonijiet suffiċjenti ta' testijiet biex tithalla 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 angli baxxi). L-għadd ta' replikati f'kull trattament jista' jtnaqqas jekk l-għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti jiżdied. Iz-zieda 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 hames 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, Analizi ta' Varjanza (ANOVA) is-soltu tkun adatta, bħat-test Dunnett u t-test Williams (17)(18)(19)(20). Fil-proporzjon ta' evoluzzjoni jistgħu jkun 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 wiehed 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 suggeriment għall-konċentrazzjoni rakkomandata; dan jithalla fil-ġudizzju tar-regolatur. Is-soltu jkun 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-htigijiet ta' dan it-test (normalità, varjanzi omogenji). Jista' jintuza t-t-test ta' varjanza inugwali jew test mhux parametrik, bħat-test Wilcoxon-Mann-Whitney, jekk dawn il-htigijiet ma jkunux sodisfatti. Bil-proporzjon ta' evoluzzjoni, it-test eżatt ta' Fisher ikun adatt.

PROCEDURA

Kondizzjonijiet ta' espożizzjoni

Thejijja ta' sistema ta' ilma u sediment fortifikati

22. Ammonti adatti ta' sediment formulat (ara l-paragrafi 13-14 u Appendiċi 3) jiżdiedu fir-riċipjenti tat-test biex jiffurmaw 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 tithalla taht tirwih ġentili għal sebat ijiem qabel iż-zieda tal-organizmi 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-zieda ta' ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, is-sediment jista' jitgħatta b'diska tal-plastik waqt li jkun qed jitferra' ilma fiha, u d-diska titneħħa minnufih wara. Apparati oħra jistgħu wkoll ikunu adatti.

▼ M4

23. Ir-riċipjenti tat-test għandhom ikunu mgħottijin (eż. bi platti tal-ħgieg). Jekk ikun meħtiegħ, matul l-istudju l-ilma jimtela sal-livell tal-volum originali biex dan jagħmel tajjeb għall-evaporazzjoni tal-ilma. Dan għandu jsir billi jintuża ilma distillat jew dejonizzat biex ma jithalliex jiżdied melh.

Żieda ta' organiżmi tat-test

24. Minn erba' sa hamest ijiem qabel ma l-organiżmi tat-test jiżdiedu fir-riċipjenti tat-test, għandhom jittiehdu kwantitajiet ta' bajd mill-kulturi u jitqiegħdu f'riċipjenti żgħar f'midjum ta' kulturi. Jista' jintuża midjum qadim mill-kultura ta' stokkijiet jew midjum li jkun għadu kif thejja. Jekk jintuża dan tal-aħħar, ammont żgħir ta' ikel eż. alka ħadra u/jew ftit qatriet żgħar ta' filtrat minn sospensjoni mithuna fin ta' trofof ta' ikel tal-ħut għandu jiżdied mal-midjum tal-kultura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss kwantitajiet ta' bajd migbur frisk. Normalment, il-larvi jibdwew 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 yoshimatsu* 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-faži ta' pappamoski tista' possibbilment tkun ivverifikata billi jintuża l-wisa' tal-iskutella tar-ras (6).

25. Ghoxrin larvi tal-ewwel fażi jkunu allokat i kif jinżertaw lil kull riċipjent tat-test li jkun fih is-sediment imhallat u l-ilma, billi tintuża pipetta mingħajr ponta. It-tirwiħ tal-ilma għandu jieqaf waqt li l-larvi jkunu qed jiżdiedu fir-riċipjenti 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-ghadd 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 ghoxrin siegħa wara li jkunu żdiedu l-larvi, is-sustanza għall-ittestjar tithallat fil-kolonna tal-ilma fuq, u jergħa' 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 jithallat b'attenzjoni biex is-sediment ma jitharbatx.

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-ghan 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 htegħa 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 hames konċentrazzjonijiet kif deskritt fil-paragrafi 18 sa 20.

Kontrolli

29. Riċipjenti ta' kontroll mingħajr sustanza għall-ittestjar iżda li jkunu jinkludu sediment għandhom ikunu inkluzi fit-test bl-ghadd xieraq ta' replikati (ara l-paragrafi 19-20). Jekk ikun intuża solvent għal applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar (ara l-paragrafu 16), għandu jiżdied kontroll ta' solvent ta' sediment.

▼ M4

Sistema ta' ttestjar

30. Jintużaw sistemi statiči. Sistemi semistatichi jew ta' fluss kontinwu bl-ilma ta' fuq jiggedded kull tant jew kontinwament jistghu jintużaw f'kazijiet eċċez-zjonali bhal pereżempju jekk speċifikazzjonijiet tal-kwalità tal-ilma jisfaw ma jkunux adatti għall-organizmu tat-test jew jaffettwaw l-ekwilibriju kimiku (eż. livelli ta' ossiġnu mahlul jinżlu baxxi hafna, il-konċentrazzjoni ta' prodotti ta' ekskreta toghla żżejjed jew minerali jliissu minn sediment u jaffettwaw il-pH u/jew il-melħ minerali fl-ilma). Iżda metodi oħra biex titjieb il-kwalità tal-ilma ta' fuq, bhal tirwih, għandhom normalment ikunu biżżejjed u jkunu ppreferuti.

Ikel

31. Ikun mehtieg li l-larvi jintemghu, preferibbilment kuljum jew mill-anqas tliet darbiet fil-gimgha. L-ikel tal-hut (sospensjoni fl-ilma jew ikel mithun 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. yoshimatsui*) għal kull larva kuljum jidher li jkun adegwat għal larvi żgħar għall-ewwel 10 ijiem. Jista' jkun mehtieg fit 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 jittnaqqas 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 hafna (eż. $b'log K_{ow} > 5$), jew sustanzi magħqudin b'mod kovalenti mas-sediment, l-ammont ta' ikel mehtieg biex ikunu żgurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-organismi jista' jiżdied mas-sediment formulat qabel il-perjodu ta' stabbilizzazzjoni. Għal dan, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok ikel tal-hut, eż. tista' tintuża zieda ta' 0,5 % (piż fin-nixef) ta' weraq mithun fin ta' eż. horrieqa tnigges (*Urtica dioica*), ċawsla (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaci (*Spinacia oleracea*) jew ta' materjal iehor tal-pjanti (*Cerophyl* jew ċelluloża alfa).

Kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. Tirwih 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 mahlul ma tinzix taht 60 % ta' ASV). Tirwih ikun ipprovdut permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħgieg imwahnha 2-3 cm 'il fuq mis-saff tas-sediment (jiġifieri bużżejqa wahda jew fit 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. yoshimatsui* 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 biz-zieda 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' hamest ijiem wara li jkun evolva l-ewwel adult fil-kontroll.

OSSERVAZZJONIJIET

Emergenza

35. Ikunu ddeterminati ż-żmien ta' żvilupp u l-ghadd totali ta' pappamoski rgħiel u nisa evoluti għalkollox. L-irgħiel ikunu identifikati faċilment mill-antenni tagħhom kollha pjumi.

▼ M4

36. Ir-recipienti tat-test għandhom ikunu osservati mill-anqas tliet darbiet fil-gimgha biex issir valutazzjoni viżiva ta' kull mgħiba 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 evolwew għalkollox. Is-sess u l-għadd ta' pappamoski evoluti għalkollox ikunu rreġistrati kuljum. Wara identifikazzjoni l-pappamoski jitnehhew mir-recipienti. Kull kwantità ta' bajd iddepożitata qabel ma jintemm it-test għandha tkun irreġistrata u mbagħad titneħħa biex larvi ma jithallew jergħu jidhlu 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 inkluzi recipienti addizzjonali tat-test mill-bidu, biex ikunu jistgħu jintużaw wara. Is-sediment minn dawn ir-recipienti 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 hajjin għal kull recipient tat-test u l-medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull recipient. Ikun utli li jkun iddeterminat ta' liema fażi jkunu l-larvi li jkunu baqgħu hajjin; għal dak jista' jintuża l-kejl tal-wisa' tal-iskutella tar-ras ta' kull larva.

Kejljiet 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'wahda 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. Tehid ta' kampjuni ta' sediment fil-bidu tat-test jista' jinfluwenza s-sistema ta' ttestjar (eż. tneħħija ta' larvi tat-test), għalhekk għandhom jintużaw recipienti addizzjonali tat-test biex jitwettqu determinazzjonijiet analitiċi fil-bidu u matul it-test jekk ikun jixraq (ara l-paragrafu 39). Kejljiet fis-sediment jistgħu ma jkunx meħtieġ jekk il-partizzjoni tas-sustanza għall-ittestjar bejn ilma u sediment tkun giet 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 jittiehdu kejljiet intermedji (eż. fis-7 jum) u jekk l-analiżi jkun jehtigħilha kampjuni kbar li ma jkunux jistgħu jittiehdu minn recipienti tat-test mingħajr ma tkun influwenzata s-sistema ta' ttestjar, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn recipienti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkludha 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 jassorbux, tista' wkoll tkun aċċettabbli l-filtrazzjoni. F'xi każijiet jista' ma jkunx possibbli li jkunu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori minhabba li d-daqs tal-kampjun ikun zgħir wisq.

▼ **M4***Parametri fiżikokimiċi*

41. Il-pH, ossiġnu mahlul fl-ilma tat-test u t-temperatura tat-reċipjenti tat-test għandhom jitkejlu b'mod adatt (ara l-paragrafu 10). Melh minerali fl-ilma u ammonja għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wiehed tat-test fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fit-tmiem tat-test.

DEJTA U RAPPORTAR*Trattament ta' riżultati*

42. L-ghan 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 rgħiel 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' sensitivitàjiet differenti statistikament ta' sessi, riżultati dwar irgħiel u nisa jkunu jistgħu jingabru għal analiżi ta' statistika. Id-differenzi ta' sensitività 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-nieġef ta' kull larva għal kull reċipjent għandha tkun ikkalkulata wara 10 jiem meta jkun mehtieg.
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-EC₅₀ jew għal kull EC_x ohra, tista' tintuza 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 titjeb l-omoġeneità ta' varjanza. Izda, valuri EC_x għandhom ikunu kkalkulati wara li r-rispons ikun ġie ttrasformat u tiehed lura għall-valur oriġinali.
45. Meta l-analiżi ta' statistika jkollha l-ghan li tiddetermina NOEC/LOEC b'ittestjar ta' ipoteżi, il-varjabbiltà fost reċipjenti jehtigħilha titqies, eż. b'ANOVA f'aktar stadji. Alternattivament, aktar testijiet robusti (21) jistgħu jkunu adatti f'sitwazzjonijiet fejn ikun hemm ksor tas-suppożizzjonijiet tas-soltu ta' ANOVA.

Proporzjon ta' evoluzzjoni

46. Proporzjonijiet ta' evoluzzjoni huma dejta alternattiva mhux kontinwa, u jistgħu jkunu analizzati bit-test ta' Cochran-Armitage applikat b'mod devoluttiv fejn tkun mistennija doża-rispons monotonika u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-istennija. Jekk le, jistgħu jintużaw test eżatt ta' Fisher jew dak ta' Mantel-Haenszel b'valuri "p" ta' Bonferroni-Holm aġġustati. Jekk ikun hemm evidenza ta' varjabbiltà akbar bejn replikati fl-istess konċentrazzjoni milli distribuzzjoni binomja tkun tindika (sikwit irriferuta bħala varjazzjoni "extrabinomja"), mbagħad għandhom jintużaw test robust ta' Cochran-Armitage jew dak eżatt ta' Fisher kif propost fi (21).
47. L-għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent, ne, ikun iddeterminat u diviż bl-għadd ta' larvi introdotti, na:

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

▼ **M4**

fejn:

ER = proporzjon ta' evoluzzjoni

n_e = għadd ta' pappamoski evoluti għal kull reċipjent

n_a = għadd ta' larvi introdotti għal kull reċipjent

48. Alternattiva li hija l-aktar adatta għal daqsijiet kbar ta' kampjuni, meta jkun hemm varjanza extrabinomja, hija li l-proporzjon ta' evoluzzjoni jkun ittrattat bħala rispons kontinwu u li jintużaw proċeduri bħat-test Williams meta tkun mistennija doża-rispons monotonika u tkun konsistenti ma' din id-dejta ta' ER . It-test Dunnett ikun adatt fejn il-monotonicità ma tapplikax. Daqs kbir ta' kampjun huwa ddefinit hawn bħala l-għadd evolut, u l-għadd mhux evolut ukoll ikun aktar minn hamsa, 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 jittiehed 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 paramettriċi oħra bħal medja mobbli jew interpolazzjoni sempliċi.

Rata ta' żvilupp

51. Il-hin medju ta' żvilupp jirrappreżenta t-tul medju ta' żmien bejn id-dhul 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-dhul). Ir-rata ta' żvilupp hija r-reċiproka taż-żmien tal-iżvilupp (unità: 1/jum) u tirrappreżenta dik il-parti tal-iżvilupp tal-larva li ssehh kuljum. Ir-rata ta' żvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar tossiċità ta' sediment minhabba 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 paramettriku 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 evolwew fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn jum x u jum $x-1$ (1 = tul tal-intervall ta' spezzjoni, is-soltu jum 1). Ir-rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent (x) tkun ikkalkulata skont:

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

fejn:

$\bar{x}$: rata medja ta' żvilupp għal kull reċipjent

i : indiċi ta' intervall ta' spezzjoni

m : għadd massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

▼ M4

f_i : għadd ta' pappamoski evoluti fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e : għadd totali ta' pappamoski evoluti fit-tmiem tal-esperiment ($= \sum f_i$)

x_i : rata ta' żvilupp tal-pappamoski evoluti f'intervall i

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

fejn:

day_i : jum ta' spezzjoni (jiem minhabba applikazzjoni)

l_i : tul ta' intervall ta' spezzjoni i (jiem, is-soltu jum wiehed)

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, koefiċjent tal-partizzjoni fil-hamrija (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:

- animali 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-animalli tat-test meta jkunu ddahhlu fir-reċipjenti tat-test.

Kondizzjonijiet tat-test:

- sediment użat, jiġifieri sediment naturali jew formulat;
- għal sediment naturali, post u deskrizzjoni ta' sit ta' teħid ta' kampjuni ta' sediment, inkluża, jekk ikun possibbli, storja ta' kontaminazzjoni; karatteristiċi: pH, kontenut ta' karbonju organiku, proporzjon ta' C/N u granulometrija (skont kif jixraq).
- thejġija tas-sediment formulat: ingredjenti u karatteristiċi (kontenut ta' karbonju organiku, pH, rtubija, eċċ. fil-bidu tat-test);
- thejġija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (konċentrazzjoni tal-ossigenu, pH, konduttività, melh 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' thejġija ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet u konċentrazzjonijiet ta' testijiet;

▼ **M4**

- applikazzjoni ta' sustanza għall-ittestjar: konċentrazzjonijiet ta' testijiet użati, għadd ta' replikati u użu ta' solvent jekk ikun hemm;
- kondizzjonijiet ta' inkubazzjoni: temperatura, ċiklu ta' dawl u intensità, tirwih (frekwenza u intensità);
- informazzjoni dettaljata dwar għalf inkluż tip ta' ikel, thejjija, ammont u reġim ta' għalf.

Riżultati:

- il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejla tat-testijiet u r-riżultati tal-analizi kollha biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza għall-ittestjar fir-reċipjent tat-test;
- il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, jiġifieri pH, temperatura, ossiġnu maħlul, melħ minerali fl-ilma u ammonja;
- bdil ta' ilma evaporat tat-test, jekk ikun hemm;
- għadd ta' pappamoski evoluti rġiel u nisa għal kull reċipjent u għal kull jum;
- għadd ta' larvi li jkunu naqsu li jevolvu bħala pappamoski għal kull reċipjent;
- medja tal-piż fin-niexef ta' kull larva għal kull reċipjent, u għal kull fażi, skont il-każ;
- perċentwali ta' evoluzzjoni għal kull replika u konċentrazzjoni tat-test (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);
- rata medja ta' żvilupp ta' pappamoski żviluppati għalkollox għal kull replika u rata ta' trattament (pappamoski rġiel u nisa miġburin flimkien);
- stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi eż. CEx (u intervalli assoċjati ta' kunfidenza), NOEC u/jew LOEC u l-metodi ta' statistika użati għad-determinazzjoni tagħhom;
- diskussjoni tar-riżultati, inkluża kull influwenza fuq il-konklużjonijiet tar-riżultati tat-testijiet minn devjazzjonijiet minn dan il-Metodu ta' Ttestjar.

LETTERATURA:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the 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 Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼ **M4**

- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. 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 Canada (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: Tossicità għal Hniet,
- (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 zero dose control. Biometrics 27: 103-117.
- (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.
- (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.
- (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.
- (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼ M4*Appendiċi 1*

DEFINIZZJONIJIET

Għall-fini ta'dan il-metodu jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sediment ifformulat jew sediment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku, huwa tahlita 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 jikkupa l-ispazju bejn sediment u partikkel tal-hamrija.

Ilma fortifikat huwa l-ilma tat-test li miegħu tkun giet miżjuda s-sustanza għall-ittestjar.

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

▼ **M4***Appendiċi 2***Rakkomandazzjonijiet għal kultura ta' *Chironomus riparius***

1. Larvi ta' *Chironomus* jistgħu jtkabbru 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-qiegh tal-kontenitur. Kieselguhr (eż. Merck, Art 8117) ukoll intwera li huwa substrat adatt (saff irqaq ta' sa ftit hafna mm ikun biżżejjed). Wara jizdied ilma adattat għal fond ta' diversi cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jimtlew kull meta huwa mehtieg biex jiehdu post it-telf li jirrizulta mill-evaporazzjoni, u jkun ta' repevenzjoni kontra d-dessekazzjoni. L-ilma jista' jinbidel jekk ikun mehtieg. Għandu jkun ipprovdut tirwih bil-mod. Ir-riċipjenti għat-tkabbir tal-larvi għandhom jinżammu f'gagġa apposta li ma thallix li l-adulti li jkunu qed jevolvu jaharbu. Il-gagġa għandha tkun kbira biżżejjed biex adulti evoluti ma jithallewx jimirhu fi qtajja kbar, għax inkella tista' ma ssirx kopulazzjoni (il-minimu huwa ta' madwar 30 x 30 x 30 cm).
2. Gagġe 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' tfixx ir-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuża kull ilma tajjeb naturali jew sintetiku. Komunement jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit li jkun tneħhielu l-kloru u midja artifiċjali (eż. il-midjum Elendt "M4" jew "M7", ara hawn taht). L-ilma għandu jitrewwah qabel ma jintuża. Jekk ikun mehtieg, l-ilma tal-kultura jista' jigġedded billi l-ilma użat jitferra' jew jgħaddi minn go sifun minn riċipjenti ta' kultura b'attenzjoni mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larvi.

Tmigh tal-larvi

4. Larvi ta' *Chironomus* għandhom jintemgħu ikel ta' trofof tal-hut (Tetra Min®, Tetra Phyll® jew marka simili ohra ta' ikel tal-hut proprjetarju), f'bejn wiehied u iehor 250 mg għal kull riċipjent kuljum. Dan jista' jingħata bhala trab mithun niexef jew bhala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ta' ikel ta' trofof jizdied ma' 20 ml ta' ilma ta' dilwizzjoni u jithallat biex jagħti tahlita omogena. Din it-tnejja tista' tintema' f'rata ta' madwar 5 ml għal kull riċipjent kuljum (ixxejkja qabel ma tuża). Larvi li jkollhom aktar żmien jistgħu jirċievu aktar.
5. It-tmigh jista' jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum ta' kultura "jissahhab", it-tmigh għandu jitnaqqas. Żidiet ta' ikel għandhom ikunu mmonitorjati b'attenzjoni. Ikel mill-anqas jikkawża tluq tal-larvi lejn il-kolonna tal-ilma, u hafna ikel jikkawża aktar attività mikrobika u konċentrazzjonijiet tal-ossigenu mnaqqsin. Iz-żewġ kondizzjonijiet jistgħu jgħibu magħhom rati ta' tkabbir imnaqqas.
6. Xi ċelluli ta' alka ħadra (eż. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) jistgħu wkoll jizdiedu meta jitqiegħdu f'riċipjenti ġodda ta' kultura.

Tmigh ta' adulti evoluti

7. Xi whud minn dawk li jagħmlu esperimenti ssuġġerew li kuxxinett tat-tajjar mghaddas f'soluzzjoni saturata tas-sukrożju jista' jservi ta' ikel għal adulti evoluti.

▼ **M4****Emergenza**

8. F'20 + 2 °C adulti jibdew jevolvu mir-riċipjenti għat-tkabbir tal-larvi wara bejn wiehied u iehor 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-riċipjenti kollha għat-tkabbir tal-larvi għandhom ikunu eżaminati tliet darbiet fil-gimgha għal tqeghid ta' kwantitajiet ta' bajd qisu ġelatina. Jekk ikun hemm, il-kwantitajiet ta' bajd għandhom jitnehhew b'attenzjoni. Il-bajd għandu jkun ittrasferit għal go diox xgħir li jkun fih kampjun tal-ilma tat-trobbija. Kwantitajiet ta' bajd jintużaw biex jinbada riċipjent ġdid ta' kultura (eż. 2 - 4 kwantitajiet ta' bajd/riċipjent) jew biex jintużaw għal testijiet tat-tossicità.
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 riċipjent ġdid ta' kultura tal-larvi kull gimgha jew anqas ta' spiss skont htigijiet ta' ttestjar, billi jitnehhew ir-riċipjenti aktar qodma wara li jkunu evolwew pappamoski adulti. Bl-użu ta' din is-sistema jkun hemm provvista regolari ta' adulti b'anqas maniġġar.

Thejġija ta' soluzzjonijiet tat-testijiet "M4" u "M7"

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midjum "M4". Il-midjum "M7" jithejja bħala l-midjum "M4" hlief għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom konċentrazzjonijiet ikunu erba' darbiet aktar baxxi f'"M7" milli f'"M4". Qed tithejja 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 H₂O, NaNO₃, KH₂PO₄ u K₂HPO₄ mogħtija għall-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet stokk mhumiex adegwati.

Thejġija tal-midjum "M7"

13. Each soluzzjoni ta' stokkijiet (I) tithejja wahda wahda u soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II) tithejja 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 jithejja l-midjum "M7". Tithejja 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 f'it qabel ma jintuza. (Is-soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini tinħażen iffrizata f'alikwoti xgħar). Il-midjum jitrewwah 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 thejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): hallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u aghmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl ₂ · 4 H ₂ O (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼ **M4**

Soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I)	Ammont (mg) magħmul minn sa 1 litru ta' ilma dejonizzat	Biex thejji s-soluzzjoni ta' stokkijiet flimkien (II): hallat l-ammonti li ġejjin (ml) ta' soluzzjonijiet ta' stokkijiet (I) u aghmel sa 1 litru ta' ilma dejonizzat		Koncentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ · 6 H ₂ O (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2 H ₂ O (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7 H ₂ O (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 taht.

(2) Dawn is-soluzzjonijiet jithejjew wahda wahda, mbagħad jitferrghu 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 jithejja midjum M4 and M7 (ml/l)	Koncentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-testijiet M4 u M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Tabella 3

Soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini għall-midjum M4 u M7

It-tliet soluzzjonijiet kollha ta' vitamini jingħaqdu flimkien biex jagħmlu soluzzjoni waħda ta' stokkijiet ta' vitamini.

	Ammont magħmul minn sa 1 litru ta' ilma de- nizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjoni ta' stokkijiet ta' vitamini miżjudin biex jithejja midjum M4 u M7 (ml/l)	Koncentrazzjoni- jiet finali f' soluz- zjonijiet tat-testi- jiet M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tijamina	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

LETTERATURA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼ **M4***Appendiċi 3***THEJJJA 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' hażiż Sphagnum, qrib kemm jista' jkun ta' pH 5,5-6,0 mingħajr ma tibqa' tidher il-pjanta, mithun 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-zieda ta' pit u ramel	2 ($\pm 0,5$)
Karbonat tal-kalċju	CaCO_3 , pulverizzat, kemikament pur	0,05 - 0,1
Ilma	Konduttività ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30 - 50

Thejjja

Il-pit jitnixxef bl-arja u jintahan fi trab fin. Tithejja sospensjoni tal-ammont mehtieg ta' trab tal-pit f' ilma dejonizzat billi jintuza apparat ta' omoġeneizzazzjoni ta' prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-suspensjoni jiġi aġġustat sa $5,5 \pm 0,5$ b' CaCO_3 . Is-suspensjoni tiġi kkondizzjonata għal mill-anqas jumejn billi tithawwad bil-mod f' 20 ± 2 °C, biex il-pH isir stabbli u jistabbilixxi komponent mikrobiku stabbli. Il-pH jerga' jitkejjel u għandu jkun $6,0 \pm 0,5$. Mbagħad is-suspensjoni tal-pit tithallat mal-kostitwenti l-oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ma' ilma dejonizzat biex jinkiseb sediment omoġenu b' kontenut ta' ilma f' firxa ta' 30-50 % tal-piż fin-niexef tas-sediment. Il-pH tat-tahlita finali jerga' jitkejjel għal darb'ohra u jiġi aġġustat għal 6,5 sa 7,5 b' CaCO_3 jekk ikun mehtieg. Jittiehdu kampjuni tas-sediment biex ikun iddeterminat il-piż fin-niexef u l-kontenut ta' karbonju organiku. Mbagħad, qabel ma jintuza 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.

Hzin

Il-kostitwenti nixfin għat-thejjja tas-sediment artifiċjali jistgħu jinħaznu f' post niexef u frisk f' temperatura ambjentali. Is-sediment formulat (mxarrab) m'għandux jinħazen qabel ma jsir użu minnu fit-test. Għandu jintuza minnufih wara l-perjodu ta' kondizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-thejjja tiegħu.

LETTERATURA:

Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness. Tossiċità għal Hniex.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

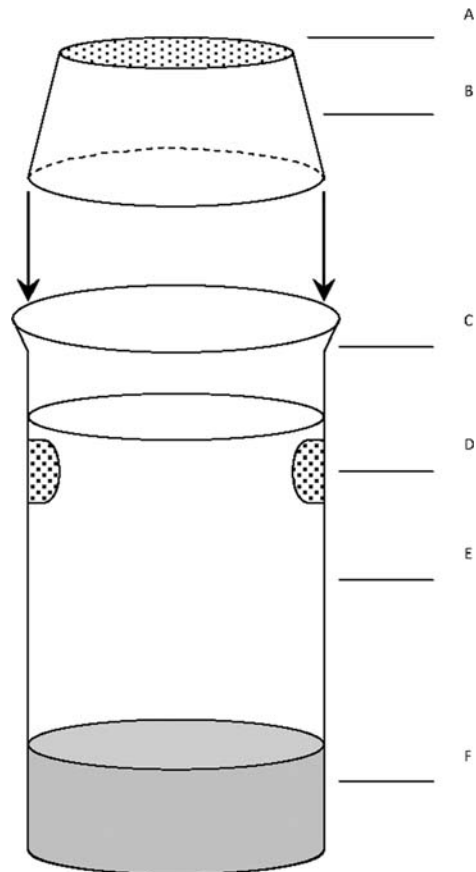
▼ **M4***Appendiċi 4***Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli**

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' polikloro-bifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

(*) Izda għandu jkun innotat li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn joni tal-melħ minerali fl-ilma u s-sustanza għall-ittestjar, għandu jintuża ilma b'anqas melħ minerali (u għalhekk, m'għandux jintuża l-midjum Elendt M4 f'din is-sitwazzjoni).

▼ **M4***Appendiċi 5***Gwida għall-monitoraġġ tal-evoluzzjoni ta' larvi kironomidi**

Sifuni ta' evoluzzjoni jitqiegħdu fuq il-bekkijiet tat-test. Dawn is-sifuni jkunu meħtieġa mill-20 jum sa meta jintemm it-test. Eżempju ta' sifun li jintuża huwa pingūt hawn taħt:



A: l-iskrijn tan-nylon

D: il-portijiet tal-iskrijn li jibdlu l-ilma

B: il-kikkri tal-plastik maqluba

E: ilma

C: il-bekk ta' espożizzjoni mingħajr xoffa

F: sediment

▼M4

C.29. BIJODEGRADABBILTÀ FAĊLI - CO₂ F'REĊIPJENTI
SSIĠILLATI (TEST TA' SPAZJU FUQ)

DAHLA

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' tgharbil 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 (CO₂) (1), ibbażat fuq it-test originali 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 f'it jinhallu u ta' dawk li jassorbu hafna. Il-metodu jintgħażel ukoll għal kimiċi li jinhallu (izda li mhumiex volatili), minhabba li l-evoluzzjoni tad-diossidu tal-karbonju titqies minn hafna li hija l-unika prova inekwivoka ta' attività mikrobika. It-tnehhija ta' karbonju organiku mahlul tista' ssir bi proċessi fiżikokimiċi - sorbiment, volatilizzazzjoni, preċipitazzjoni, idroliżi - kif ukoll b'azzjoni mikrobika, u hafna reazzjonijiet mhux bijoloġiċi jikkunsmaw ossiġnu; CO₂ rarament ikun prodott minn kimiċi organiċi b'mod abijotiku. Fit-test originali u modifikat ta' Sturm (1)(2) CO₂ jitneħha mill-fażi likwida għal ġor-reċipjenti ta' assorbiment b'tixrix (jiġifieri arja kollha b'zieaq ittrattata biex tneħhi CO₂ permezz tal-midjum likwidu), filwaqt li fil-verżjoni ta' Larson (3)(4) CO₂ jiġi ttrasferit mir-reċipjent ta' reazzjoni għal ġor-reċipjenti ta' assorbiment billi l-arja minghajr CO₂ tghaddi 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 jinhallux f'ISO 9439 (5) u fil-verżjoni originali tal-US (6), li t-tnejn li huma jispeċifikaw it-tixrix milli l-bdil tal-Ispazju Fuq. F'metodu uffċjali iehor ta' EPA tal-US (7) ibbażat fuq il-metodu ta' Gledhill (8), ir-reċipjent ta' reazzjoni xxejkjat jingħalaq għall-atmosfera u CO₂ prodott jingabar f'sifun tal-aklalina direttament mill-fażi gassuża, bhal fi flieksen klassiċi ta' respiromiter ta' Warburg/Barcroft.

3. Izda 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' CO₂ fis-sifuni tal-aklalina ma kienx jirrifletti verament l-ammont ta' CO₂ prodott mikrobijoloġikament f'hinijiet intermedji matul id-degradazzjoni. Minhabba dan, l-ispeċifikazzjoni li > 60 % tal-produzzjoni ta' CO₂ massimu teoretiku (ThCO₂) għandha tingabar 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-tnehhija ta' karbonju organiku mahlul (DOC).

4. Meta l-perċentwali ta' degradazzjoni tkun valur aktar baxx milli mistenni, IC ikun possibbilment akkumulat fis-soluzzjoni tat-test. Mbagħad id-degradabbiltà tista' tkun ivvalutata mat-testijiet l-oħra lesti tal-bijodegradabbiltà.

▼M4

5. Żvantaġġi oħra tal-metodoloġija Sturm (goffa, tiegħu ż-żmien, aktar suxxet-tibbli għal żbalji sperimentali u mhix applikabbli għal kimiċi volatili) aktar qabel kienu ġieghlu 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 CO₂ thalla johroġ fl-Ispazju Fuq fit-tmien ta' inkubazzjoni b'acidifikazzjoni tal-midjum. CO₂ tkejjel b'analizi tal-kromatografija tal-gass (GC)/IC f'kampjuni meħudin awtomatikament tal-Ispazju Fuq iżda ma tqisx il-karbonju inorganiku mahlul (DIC) fil-fażi likwida. Ir-reċipjenti użati wkoll kienu żgħar hafna (20 ml) u kienu jeżgħu biss 10 ml ta' midjum, li holqu problemi eż. meta jiżdiedu l-ammoniti bilfors żgħar hafna ta' kimiċi għall-ittestjar li ma jinhallux, u/jew meta jista' ma jkunx hemm mikroorganizmi 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) CO₂ jitkejjel fl-Ispazju Fuq wara acidifikazzjoni 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. Iz-żewġ metodi kellhom vantaġġi fuq it-test Sturm għaliex is-sistema ta' ttestjar kienet aktar kompatta u mmanigġabbli, kimiċi volatili jistgħu jiġu ttestjati u tkun evitata l-possibbiltà ta' dewmien biex jitkejjel CO₂ prodott.
7. Iz-żewġ approċċi nġhaqdu f'CO₂ 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, iz-żewġ approċċi kienu użati fl-EPA tal-US (18). Kienu rrakkomandati żewġ metodi ta' kejl ta' CO₂, jiġifieri CO₂ fl-Ispazju Fuq wara acidifikazzjoni (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 jixxiebbu hafna 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' lqugh ta' melh minerali li jkun tlaqqam bi kwantità mhallta ta' mikroorganizmi. It-test isir fi fliexken issiġillati bi Spazju Fuq ta' arja li jipprovdri riżerva ta' ossiġnu għal bijodegradazzjoni aerobika. L-evoluzzjoni ta' CO₂ 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-tnehhija ta' DOC u/jew kemm ikun hemm bijodegradazzjoni primarja tal-kimika għall-ittestjar (20).

▼ M4

INFORMAZZJONI DWAR IL-KIMIKA GHALL-ITTESTJAR

10. Il-kontenut ta' karbonju organiku (% w/w) tal-kimika għall-ittestjar jehtieglu 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-ligi ta' Henry jkun utli biex ikun iddeterminat proporzjon adatt ta' Spazju Fuq ma' volum ta' likwidu. Informazzjoni dwar it-tossicità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganizmi tkun utli fl-ghażla ta' koncentrazzjoni adatta tat-test u għall-interpretazzjoni ta' riżultati li juru bijodegradabbiltà fqira: huwa rrakkomandat li jkun inkluz 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 jinhallux, 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-ligi ta' Henry ta' sa $50 \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ minhabba 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 fit jinhallu fl-ilma. Iżda dawk li jużaw għandhom jiżguraw li l-proporzjon tal-Ispazju Fuq ma' volum ta' likwidu u l-koncentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar ikunu hekk li jkun hemm ossiġnu biżżejjed biex tithalla ssir bijodegradazzjoni aerobika shiha (eż. evita li tuża koncentrazzjoni 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-ghan jistgħu jintużaw anilina, benzoat tas-sodju jew glikol tal-etilen meta jkunu ttestjati kimiċi għall-ittestjar li jinhallu fl-ilma u ottanol-1 għal kimiċi għall-ittestjar li f'it jinhallu (13). Il-bijodegradazzjoni ta' dawn il-kimiċi għandha tilhaq > 60 % ThIC fi żmien 14-il jum.

RIPRODUĊIBILTÀ

13. Fir-ring test tal-ISO tal-metodu (17), ir-riżultati li ġejjin inkisbu bl-użu tal-kondizzjonijiet irrakkomandati, inkluz 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 aghar, il-varjabbiltà akbar aktarx kienet dovuta minhabba produzzjoni għolja ta' IC fl-in bjanki. Ir-replikabbiltà kienet aghar b'ottanol-1 iżda kienet għadha anqas minn 10 % għal 79 % ta' testijiet li saru. Din il-varjabbiltà akbar fit-test setgħet kienet dovuta minhabba żbalji fid-dożar, minhabba li kellu jkun injettat volum żgħir (3 sa 4 µl) ta' ottanol-1 fi flieksen tat-test issigillati. Koeffiċjenti oghla tal-varjazzjoni jirriżultaw meta jintużaw koncentrazzjonijiet iktar baxxi tal-kimika għall-ittestjar, speċjalment f'koncentrazzjonijiet li huma inqas minn 10 mg C/l. Dan jista' jingheleb parzjalment billi titnaqqas il-koncentrazzjoni tal-karbonju inorganiku totali (TIC) fit-tilqima.

▼ **M4**

14. F'ring-test tal-UE (24) ta' hames tensjoattivi miżjudin f'10 mg C/l, nkisbu r-rizultati li ġejjin:

Kimika għall-ittestjar	Perċentwali medju ta' bijodegradazzjoni (28d)	Koeffiċjent ta' varjazzjoni (%)	Għadd ta' laboratorji
Tetrapropilin Sulfonat tal-benżen	17	45	10
Suċċinat ta' di-iso-ottil sulfoniku (anjoniku)	72	22	9
Klorur tal-ammonja eżadeċil-trimetil (*) (katjoniku)	75	13	10
Iso-Nonilfenol -(etos-silat) ₉ (mhux joniku)	41	32	10
Sulfobetaina tal-Kako-amid-propil tal-idrossi tad-dimetil (amfoterika)	60	23	11

(*) Kien miżjud SiO₂ biex jinnewtralizzat t-tossiċità.

Ir-rizultati juru li ġeneralment il-varjabbiltà kienet oghla għall-aġenti tensjoattivi anqas iddegradati sewwa. Varjabbiltà fit-test kienet anqas minn 15 % għal aktar minn 90 % tal-każijiet, bl-ogħla tilhaq 30-40 %.

NOTA: Kwazi 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 jintlahaqx "fil-perjodu ta' 10-d", anki jekk kull speċi molekulari għaliha waħidha tilhaq > 60 % fi żmien 10 jiem jekk tkun ittestjata wahidha. Dan jista' jkun osservat ukoll f'taħlitiet oħra kumplessi.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

15. Apparat normali tal-laboratorju u:

- Fliexken tas-serum tal-ħgieg, issigillati b'tappijiet tal-lastku tal-butyl u sigilli tal-aluminju li jehel. Id-daqs rakkomandat huwa 125 ml li jkollu volum totali ta' madwar 160 ml (f'dan il-każ il-volum ta' kull flixxum għandu jkun magħruf li huwa 160 ± 1 ml). Reċipjent ta' daqs iżgħar jista' jintuza meta r-rizultati jharsu l-kondizzjonijiet deskritti fil-paragrafu 66 u 67;
- Analizzatur tal-karbonju jew strument iehor (eż. kromatografu tal-gass) għall-kejl ta' karbonju inorganiku;

▼ **M4**

- (c) Siringi ta' preċiżjoni kbira għal kampjuni gassużi u likwidi;
- (d) Xejker orbitali f'ambjent ikkontrollat bit-temperatura;
- (e) Provvista ta' arja mingħajr CO_2 – din tista' tithejja billi l-għarja tgħaddi minn granijiet tal-gir tas-soda jew billi tintuża tahlita ta' gass ta' 80 % $\text{N}_2/20$ % O_2 (fakultattiv) (ara l-paragrafu 28);
- (f) Apparat ta' filtrazzjoni b'membrani ta' porozità ta' 0,20 – 0,45 μm porozità (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' melh minerali

18. Is-soluzzjonijiet ta' stokkijiet u l-midjum ta' melh 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. Hejji 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40 g

Klorur tal-ammonju (NH_4Cl) 0,50 g

Holl fl-ilma u ġib 1 litru. Il-pH ta' din is-soluzzjoni għandu jkun 7,4 ($\pm 0,2$). Jekk dan ma jkunx il-każ, allura hejji soluzzjoni ġdida.

- (b) Klorur tal-kalċju diidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4 mg; 36,40 g

Holl fl-ilma u ġib 1 litru.

- (c) Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g

Holl fl-ilma u ġib 1 litru.

- (d) Eksaidrat tal-klorur tal-ħadid (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g

Holl fl-ilma u ġib 1 litru u żid qatra wahda ta' HCl konċentrat.

Thejjiġa ta' midjum minerali

19. Hallat 10 ml ta' soluzzjoni (a) ma' bejn wiehed u iehor 800 ml ilma (paragrafu 17), mbagħad żid 1 ml ta' soluzzjonijiet (b), (c) u (d) u ġib 1 litru bl-ilma (paragrafu 17).

Reaġenti ohra

20. Aċidu ortofosforiku konċentrat (H_3PO_4) (> 85 % massa għal kull volum).

▼M4

Soluzzjoni 7M ta' idrossidu tas-sodju

21. Holl 280 g ta' idrossidu tas-sodju (NaOH) f'1 litru ta' ilma (paragrafu 17). Iddetermina l-koncentrazzjoni ta' DIC ta' din is-soluzzjoni u qis dan il-valur meta tikkalkula r-rizultat tat-test (ara l-paragrafi 55 u 61), l-aktar fid-dawl tal-kriterju tal-validità fil-paragrafu 66 (b). Hejji soluzzjoni ġdida jekk il-koncentrazzjoni ta' DIC tkun għolja zżejjed.

Kimika għall-ittestjar:

22. Hejji soluzzjoni ta' stokkijiet ta' kimika għall-ittestjar li tinhall biżżejjed fl-ilma (paragrafu 17) jew fil-midjum tal-ittestjar (paragrafu 19) f'koncentrazzjoni preferibbilment ta' 100 darba akbar mill-koncentrazzjoni finali li jkollha tintuża fit-test; jista' jkun mehtieg li jkun aġġustat pH tas-soluzzjoni ta' stokkijiet. Is-soluzzjoni ta' stokkijiet għandha tizzied mal-midjum minerali biex tagħti koncentrazzjoni ta' karbonju organiku finali ta' bejn 2 u 40 mg C/l, preferibbilment 20 mg C/l. Jekk jintużaw koncentrazzjonijiet iktar baxxi minn dawn, il-preċiżjoni miskuba tista' ma tkunx tajba. Kimiċi likwidi li jinħallu u li ma jinħallux jistgħu jiżiedu fir-reċipjenti billi jintużaw direttament siringi ta' preċiżjoni kbira. Kimiċi għall-ittestjar li f'it jinħallu u li ma jinħallux jista' jkun jehtigilhom trattament speċjali (25). L-għażliet huma:

- (a) zieda diretta ta' ammonti miżuna magħrufa;
- (b) tixrid ultrasoniku qabel zieda;
- (c) tixrid bl-ghajjnuna ta' aġenti emulsjonanti li jkunu mehtieġa biex ikun stabbilit jekk ikollhom 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 zieda diretta ta' ammonti magħrufin;
- (e) zieda ta' volum magħruf ta' soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'solvent faċilment volatili f'reċipjent tat-test vojta, 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. Hejji soluzzjoni ta' stokkijiet tal-kimika ta' referenza (li tinhall) fl-ilma (paragrafu 17) f'koncentrazzjoni preferibbilment 100 darba akbar mill-koncentrazzjoni finali 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-koncentrazzjoni li fiha tkun applikata fit-test. Verifika ta' inibizzjoni tista' tkun inkluża fit-tifsila tat-test biex tithaffet 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 f'it degradazzjoni tkun attribwibbli biss għall-fatt li ma tkunx soġġetta għal attakk mikrobiku taħt il-kondizzjonijiet tat-test. Biex tinkiseb informazzjoni dwar it-tossicità tal-kimika għall-ittestjar għal mikroorganizi (aerobiċi), hejji soluzzjoni fil-midjum tal-ittestjar li jkun fiha l-kimika għall-ittestjar u l-kimika ta' referenza (paragrafu 19), kull waħda fl-istess koncentrazzjonijiet kif miżjuda, rispettivament (ara l-paragrafi 22 u 23).

▼ M4

Tilqima

25. It-tilqima tista' tkun ġejja minn varjetà ta' sorsi: hama attivat; effluwent tad-dranagġ (mhux bil-kloru); ilmijiet tal-wieċ u hamrija; jew minn tahlita ta' dawn (20). L-attività bijodegradattiva tas-sors għandha tkun ivverifikata billi tintuża kimika ta' referenza. Ikun xi jkun is-sors, mikroorganizmi li qabel kienu esposti għall-kimika għall-ittestjar m'għandhomx jintużaw jekk il-proċedura jkollha tintuża bħala test għal bijodegradabbiltà faċli.

Twissija: Hama 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-tahlita finali;
- normalment jagħti konċentrazzjoni ta' 4 mg/l ta' solidi sospiżi fit-tahlita finali meta jintuża hama attivat; jistgħu jintużaw konċentrazzjonijiet sa 30 mg/l iżda jistgħu jżidu b'mod sinifikanti l-produzzjoni ta' CO₂ tal-inbjanki (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.

Hama attivat

27. Hama attivat jingabar frisk mit-tank ta' tirwih ta' impjant ta' trattament tad-dranaġġ jew minn unità ta' skala ta' laboratorju li tittratta l-aktar dranaġġ domestiku. Jekk ikun meħtieġ, partċelli raffi għandhom jitnehhew billi jintgħarblu (eż. billi jintuża għarbiel b'xibka ta' 1 mm²) u l-hama għandu jinzamm aerobiku sakemm jintuża.
28. Alternattivament, wara tneħħija ta' kull partikola raffa, halli l-hama joqgħod jew iċċentrifugah (eż. 1 100 x g għal 10 minuti). Warrab il-likwidu supernatant. Il-hama jista' jinhasel fis-soluzzjoni minerali. Issospendi l-hama konċentrat f'midjum minerali biex jirrendi konċentrazzjoni ta' 3-5 g solidi sospiżi/l.
29. Hama għandu jittiehed minn impjant ta' trattament konvenzjonali li jahdem sewwa. Jekk hama jkollu jittiehed minn impjant ta' trattament ta' rata għolja, jew jitqies li jkun fih inibituri, huwa għandu jinhasel. Hallih joqgħod jew iċċentrifuga l-hama sospiż mill-ġdid wara li jkun thallat sewwa, warrab il-likwidu supernatant u erga' ssospendi l-hama maħsul f'volum ulterjuri ta' midjum minerali. Tenni din il-proċedura sakemm il-hama jitqies li jkun hieles minn substrat jew inibitur żejjed.
30. Wara li tkun inkisbet sospensjoni kompleta, jew b'hama mhux ittrattat, irtira kampjun eżatt qabel l-użu, għad-determinazzjoni tal-piż fin-niexef tas-solidi sospiżi.
31. Alternattiva ulterjuri hija li hama attivat jiġi omoġeinizzat (3-5 g ta' solidi sospiżi/l). Ittratta l-hama fi blender Waring għal 2 minuti b'veloċità medja. Halli l-hama mħallat joqgħod għal 30 minuta jew aktar jekk ikun meħtieġ u ferra' l-likwidu għal użu bħala tilqima bir-rata ta' madwar 10 mg/l ta' midjum minerali.

▼M4

32. Tnaqqis ukoll ulterjuri tal-evoluzzjoni CO₂ in bjank jista' jinkiseb billi l-hama jitrewwah matul il-lejl b'arja minghajr CO₂. Uza 4 mg/l ta' solidi ta' hama attivati bhala l-koncentrazzjoni 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 uza fil-jum tal-ġbir, jew ikkondizzjonah minn qabel jekk ikun mehtieġ. L-effluwent għandu jkun iffiltrat permezz ta' filtru raff biex titneħħa materja partikolata hoxna u jitkejjel il-valur tal-pH.

34. Biex inaqqas il-kontenut ta' IC tiegħu, il-filtrat jitraxxax b'arja minghajr CO₂ (paragrafu 15-e) għal siegħa filwaqt li l-pH jinżamm f'6,5 billi jintuza aċidu ortofosforiku (paragrafu 20). Il-valur tal-pH jitregġa għall-valur oriġinali tiegħu bl-idrossidu tas-sodju (paragrafu 21) u, wara li jkun qagħad għal madwar siegħa, volum adatt tas-supernatant jittiehed biex jitlaqqam. Din il-proċedura ta' tixrix tnaqqas il-kontenut ta' IC tat-tilqima. Pereżempju, meta l-volum massimu rrakkomandat ta' effluwent imrassax iffiltrat (100 ml) għal kull litru kien użat bhala tilqima, l-ammont ta' IC li kien hemm fir-riċipjenti 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. Jittiehed kampjun ta' ilma tal-wiċċ adatt. Għandu jinżamm f'kondizzjonijiet aerobiċi u jintuza fil-jum tal-ġbir. Il-kampjun għandu jkun ikkondensat, jekk ikun mehtieġ, b'filtrazzjoni jew ċentrifugazzjoni. Il-volum ta' tilqima li jkollha tintuża f'kull riċipjent tat-test għandha thares il-kriterji mogħtijin fil-paragrafu 26.

Hamrija

36. Jittiehed kampjun ta' hamrija adatta, miġbura f'fond ta' sa 20 cm taht il-hamrija tal-wiċċ. Ġebel, fdalijiet ta' pjanti u invertebrati għandhom jitneħħew mill-kampjun ta' hamrija qabel ma jintgħarbel b'xibka ta' 2 mm (jekk il-kampjun ikun imxarrab wisq biex jintgħarbel minnufih, f'dak il-każ għandu jgħidli parzjalment bl-arja biex jithaffef it-tgħarbil). Għandu jinżamm f'kondizzjonijiet aerobiċi u jintuza fil-jum tal-ġbir (Jekk il-kampjun jingarr f'borża sewda tal-polietilen maqfula hafif, ikun jista' jinhzen 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' CO₂ in bjank. Kondizzjonament minn qabel jikkonsisti f'tirwih ta' hama attivati wara dilwizzjoni f'midjum tal-ittestjar għal 30 mg/l b'arja niedja minghajr CO₂ għal sa 5-7 ijiem fit-temperatura tat-test.

PROCEDURA TAT-TEST

Għadd ta' fliexken

38. L-għadd ta' fliexken (paragrafu 15-a) mehtieġa 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 hames fliexken tat-test (paragrafu 15-a) mis-settijiet (a), (b) u (c) (ara l-paragrafu 42) ikunu analizzati fit-tmiem tat-test, biex ikunu jistgħu jiġu kkalkulati 95 % ta' intervalli ta' kunfidenza għall-valur medju ta' perċentwali ta' bijodegradazzjoni.

▼ **M4***Midjum imlaqqam*

40. It-tilqima tintuża f'konċentrazzjoni ta' 4 mg/l ta' solidi nixfin ta' ħama attivata. Hejji minnufih qabel l-użu midja mlaqqma b'mod suffiċjenti billi żżid, pereżempju, 2 ml ħama attivata 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.

Thejjija 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' wiehed miż-żewġ tipi, għandha tingħata attenzjoni biex ikun żgurat li l-midjum imlaqqam jithallat b'mod adegwat biex ikun żgurat li jitqassam b'mod uniformi fil-fliexken tat-test.
42. Settijiet ta' fliexken (paragrafu 15a) jithejjew biex jesgħu dan li ġej:
- (a) Reċipjent tat-test (indikati 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-ħgieġ użati biex tiddaħhal 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 jinhallu 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 jinhallux u kimiċi ta' referenza li jinhallu jiżdiedu fi fliexken b'varjetà ta' modi (ara l-paragrafu 22a-e) skont in-natura tal-kimika għall-ittestjar, qabel jew wara zieda tal-midjum imlaqqam, skont il-metodu ta' trattament tal-kimika għall-ittestjar. Jekk tkun użata wahda 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 go 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 tithalla ssir bijodegradazzjoni kompleta.

▼ M4

47. Il-fliexken kollha mbagħad jiġu ssiġillati, pereżempju b'septa tal-lastku tal-butyl 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 hin għal konċentrazzjoni tal-bidu ta' IC (kontrolli sterili, paragrafu 42e) jew għal determinanti ohra, erfa' kampjun adatt mir-reċipjent tat-test. Ir-reċipjent tat-test u l-kontenut tiegħu mbagħad jitwarribu.
48. Il-fliexken issiġillati jitqiegħdu fuq xejker rotatorju (paragrafu 15d), b'rata ta' xxejkjar suffiċjenti biex iżzomm 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.

Tehid ta' kampjuni

49. Ix-xejra ta' tehid 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-tehid tal-kampjuni, li għandu jsir mill-anqas darba fil-gimgha jew aktar sikwit (eż. darbtejn fil-gimgha) jekk tkun mehtieġa kurva kompleta ta' degradazzjoni. L-għadd mehtieġ għall-fliexken tar-replikati jittiehed 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. Hu kampjuni minn hames 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' percentwali ta' bijodegradazzjoni. Fliexken li jirrappreżentaw il-verifiki għal inibizzjoni u għal degradazzjoni abijotika jistgħu ma jittehdulhomx kampjuni sikwit daqs il-fliexken l-ohra; 1 jum u 28 jiem ikunu suffiċjenti.

Analiżi ta' karbonju inorganiku (IC)

50. Il-produzzjoni ta' CO₂ 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 taht. Minhabba li l-metodi jistgħu jagħtu riżultati f'it differenti, wiehed 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 ehfef għal laboratorji li jużaw analizzaturi tal-karbonju biex ikejlu IC. Huwa importanti li s-soluzzjoni tal-idrossidu tas-sodju (paragrafu 21) użata biex CO₂ jinbidel f'karbonat tkun jew thejjiet m'ilux jew li l-kontenut ta' IC ikun magħruf, biex din tkun tista' titqies meta jkun kkal-kulati r-riżultati tat-testijiet (ara l-paragrafu 66-b.)

Metodu (a): acidifikazzjoni 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 CO₂ f'N₂). Aċidu ortofosforiku konċentrat (paragrafu 20) jiġi injettat tul is-septum ta' kull flixkun li jkun ittehdidlu kampjun biex ibaxxi l-pH tal-midjum għal < 3 (eż. žid 1 ml għal midjum tal-ittestjar ta' 107 ml). Il-fliexken jitreggħu fuq ix-xejker. Wara li jkun xxejkjati għal siegħa f'temperatura tat-test il-fliexken jitnehhew 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 reġistrati bħala mg C/l.

▼ M4

53. Il-prinċipju ta' dan il-metodu huwa li wara aċidifikazzjoni għal $\text{pH} < 3$ 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 mkejjejl 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_2CO_3) f' ilma mingħajr CO_2 mhejji 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 tgholli 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). Aghmel 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-tnehhija ta' DOC ikollha titkejjel (kimiċi għall-ittestjar biss li jinhallu fl-ilma), għandhom jittiehdu 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' analiżi, 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 ittehidlu 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 jittiehed kampjun tul it-test kollu. Jekk ikunu meħtieġa valuri IC assoluti in bjank fl-okkażjonijiet kollha ta' tehid ta' kampjuni, ikunu meħtieġa determinazzjonijiet ta' IC tas-soluzzjoni ta' NaOH kull darba li tintuża. Il-fliexken jitnehhew mix-xejker u jiħallew joqogħdu. Volumi adatti (eż. 50 għal 1 000 µl) tal-fażi likwida f'kull reċipjent jittiehdu 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 mghammar sewwa biex ikun jista' jitratta 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 negligibbli. 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 zero. Din il-verifika tal-assorbiment kwazi shih ta' CO_2 ma jkunx meħtieġ li ssir kull darba li jsir it-test.

57. Jekk it-tnehhija ta' DOC ikollha titkejjel (kimiċi għall-ittestjar biss li jinhallu fl-ilma), għandhom jittiehdu kampjuni tal-fażi likwida minn fliexken separati (li ma jkunx fihom alkali miżjud), iffiltrati b'membrana u injettati għal ġol-analizzatur ta' DOC. Dawn il-fliexken jistgħu jintużaw għal analiżi oħra daqs kemm ikun meħtieġ, biex titkejjel bijodegradazzjoni primarja.

▼ M4**DEJTA U RAPPORTAR****Kalkolu tar-riżultati**

58. Jekk wiehed jassumi mineralizzazzjoni ta' 100 % tal-kimika għall-ittestjar għal CO₂, ThIC iżjed minn dak prodott fil-kontrolli in bjank ikun daqs TOC miżjud għal kull flixkun tat-test fil-bidu tat-test, jiġifieri:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}.$$

Il-massa totali (mg) ta' karbonju inorganiku (TIC) f'kull flixkun tkun:

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

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 għaž-żewġ metodi analitiċi użati għall-kejl ta' IC f'dan it-test huma deskritti fil-paragrafi 60 u 61. Perċentwali ta' bijodegradazzjoni (% D) f'kull każ tidher bħala:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{Ekwazzjoni [2]}$$

fejn:

TIC_t = mg ta' TIC fi flixkun tat-test f'hin t;

TIC_b = mg medja ta' TIC fi flieken in bjank f'hin 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-flieken mill-ammonti rispettivi ta' TIC prodotti saż-żmien ta' kull tehid 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 wiehed jista' jikkonkludi li tkun seħhet degradazzjoni abiotika tal-kimika għall-ittestjar u din għandha titqies fil-kalkulazzjoni ta' D fl-Ekwazzjoni [2].

Aċidifikazzjoni għal pH < 3

60. Minhabba li l-aċidifikazzjoni għal pH < 3 u l-ekwilibrizzjoni biex il-konċentrazzjoni ta' TIC fil-likwidu u fil-fażijiet gassużi tkun indaqs, il-konċentrazzjoni biss ta' IC fil-fażi ta' gass tkun jehtigilha titkejjel. Għalhekk, mill-ekwazzjoni [1] $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, fejn V_B volum ta' flixkun tas-serum.

Bdil ta' CO₂ għal karbonat

61. F'dan il-metodu jsiru kalkulazzjonijiet bħal fl-Ekwazzjoni [1], iżda ma jitqisx l-ammont negligibbli ta' IC fil-fażi gassuża, jiġifieri $V_H \times C_H = 0$, u $\text{TIC} = V_L \times C_L$.

▼ **M4****Espressjoni ta' riżultati**

62. Kurva ta' bijodegradazzjoni tinkiseb bl-ipplojjjar tal-persentaġġ ta' bijodegradazzjoni, D , kontra l-hin tal-inkubazzjoni u jekk possibbli, il-fażi ta' intervalli, il-fażi ta' bijodegradazzjoni, il-perjodu ta' 10-d u l-fażi ta' livell kostanti, il-fażi li fiha d-degradazzjoni massima tkun intlaħqet u l-kurva tal-bijodegradazzjoni llivellat, kif hemm indikat. Jekk jinkisbu riżultati komparabbli għar-riċipjenti tat-test parallelli F_T ($< 20\%$ differenza), tiġi pplotjata kurva medja (ara l-Appendiċi 2, Fig. 1); jekk le, il-kurvi jiġu pplotjati għal kull riċipjent. 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' riċipjenti tat-test ma kienx biżżejjed biex jindikaw 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 pplotjata kurva għall-kimika ta' referenza F_C u, jekk inklūża 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 repiżtrati kif inhuma rreġistrati dawk fil-fliexken F_S (kontroll abijotiku), jekk dawn ir-riċipjenti kienu inklūżi fit-test.
65. Ikkalkula D għar-riċipjenti F_I abbazi tar-rendiment IC teoretiku antiċipat mill-komponent ta' referenza tat-tahlita biss. Jekk, fit-28 jum, jirriżulta $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25\%$, wiehed 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_{FI} miksubin taht 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 fformat fil-kontrolli in bjank, minhabba li konċentrazzjoni aktar baxxa xort'ohra tnaqqas mill-preċiżjoni tal-metodu. Alternattivament, tista' tintuża tilqima ohra. Jekk fi fl-ixkun F_S (abijotiku) tkun osservata zieda sinifikanti ($> 10\%$) fl-ammont ta' TIC, jistgħu jkun sejhew proċessi ta' degradazzjoni abijotika.

Validità ta' riżultati▼ **M7**

66. Test jitqies validu jekk:

- a) il-perċentwali medju ta' degradazzjoni fir-riċipjenti F_C li jkun fihom is-sustanza kimika ta' referenza jkun $> 60\%$ sal-14-il jum ta' inkubazzjoni; u
- b) l-ammont medju ta' TIC li jkun hemm fil-kontrolli inbjank F_B fi tmiem it-test ikun $< 3\text{mg C/l}$.

Jekk dawn il-limiti ma jkunux issodisfatti, it-test għandu jiġi ripetut b'inokulu minn sors iehor u/jew għandhom jerġgħu jiġu eżaminati l-proċeduri użati. Pereżempju, jekk il-produzzjoni għolja ta' inbjank IC tkun problema, għandha tkun segwita l-proċedura mogħtija fil-paragrafi 27 sa 32.

⁽¹⁾ Il-perċentwali ta' degradazzjoni fir-riċipjenti F_C li jkun fihom is-sustanza ta' referenza

⁽²⁾ Il-perċentwali ta' degradazzjoni fir-riċipjenti F_I

▼ **M4**

67. Jekk il-kimika għall-ittestjar ma tilhaqx 60 % ThIC u ma jkunx intwera li kienet inibitorja (paragrafu 65), it-test jista' jittenna b'koncentrazzjoni oghla ta' tilqim (sa 30 mg/l ta' hama attivata 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 aerobici.
69. Jekk il-valur ta' pass ta' 60 % ThIC ma jintlahaqx, iddetermina l-valur pH f'midja fi fliexken li jkun saru aċidużi jew alkalini; valur ta' anqas minn 6.5 jista' jindika li tkun seħhet nitrifikazzjoni. F'każ bhal dan tenni t-test b'soluzzjoni bafer ta' koncentrazzjoni oghla.

Rapport tat-Test

70. Ikkompila tabella ta' % ta' D għal kull test (F_T), referenza (F_C) u, jekk ikun inkluż, fliexkun ta' inibizzjoni ta' kontroll (F_I) għal kull jum li fih ikunu ttiehdu kampjun. Jekk jinkisbu riżultati komparabbli għal fliexken replikati, immarka kurva ta' medja ta' % ta' D mal-hin. 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' tnehhija 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 fizikokimiċi 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' tahwid, eċċ);
- applikazzjoni ta' kimika għall-ittestjar u kimika ta' referenza għal sistema ta' ttestjar: koncentrazzjoni tat-test użata u ammont ta' karbonju ddożat f'kull fliexkun 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 mahduma u valuri kkalkulati ta' bijodegradabbiltà f'forma tabulari;

▼ **M4**

- il-grafika ta' perċentwali ta' degradazzjoni mal-hin għat-test u kimiċi ta' referenza, il-fażi ta' intervalli, fażi ta' degradazzjoni, perjodu ta' 10-d u angli;
- 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' CO₂ (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, Mazzocchi PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.
- (12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.
- (13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.
- (14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.
- (15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼ M4

- (16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO₂ headspace test).
- (17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO₂ 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’ hama 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 CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) ISO 10634 (1996) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼ **M4***Appendiċi 1*

ABBREVIJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

IC: Karbonju inorganiku

ThCO₂: Id-dijossidu tal-karbonju teoretiku (mg) huwa l-kwantità ta' dijossidu tal-karbonju kkalkulat li għandu jiġi prodott mill-kontentu tal-karbonju magħruf jew imkejje 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 mahlul huwa l-karbonju organiku li jkun hemm f'soluzzjoni jew dak li jgħaddi minn filtru ta' 0,45 mikromiter jew jibqa' fis-supernatant wara ċentrifugazzjoni f'madwar 4 000 g (dwar 40 000 m sec⁻²) għal 15-il minuta.

DIC: Karbonju inorganiku mahlul.

ThIC: Karbonju inorganiku teoretiku

TIC: Karbonju organiku totali

Bijodegradabbli faċilment: Klassifikazzjoni arbitrarja tal-kimiċi li għaddew ċerti testijiet speċifiċi tal-iskrining għall-bijodegradabbiltà ultima; dawn it-testijiet tant huma stretti li huwa assunt li tali kimiċi se jibbijodegradaw malajr u kompletament f'ambjenti akkwatiċi taħt kondizzjonijiet aerobiċi.

Perjodu ta' 10-d: L-10 ijiem li jseguw immedjatament il-kisba ta' 10 % bijodegradazzjoni.

Bijodegradabbiltà inerenti: Klassifikazzjoni tal-kimiċi li għalihom hemm evidenza inekwivoka ta' bijodegradazzjoni (primarja jew ultima) fi kwalunkwe test ta' bijodegradabbiltà.

Bijodegradazzjoni aerobika ultima: Il-livell ta' degradazzjoni miksuba meta il-kimika għall-ittestjar tiġi totalment uttilizzata minn mikroorganizmi li jirriżultaw fil-produzzjoni tad-dijossidu tal-karbonju, l-ilma, imluha minerali u kostitwenti ċellulari mikrobjali godda (bijomassa).

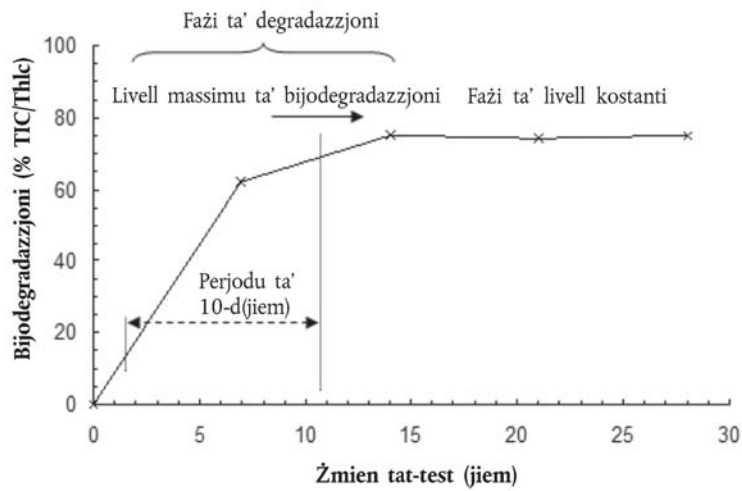
Mineralizzazzjoni: Mineralizzazzjoni hija d-degradazzjoni kompleta ta' kimika organika għal CO₂ u H₂O f'kondizzjonijiet aerobiċi, u għal CH₄, CO₂ u H₂O f'kondizzjonijiet anaerobiċi.

Fażi ta' intervalli: Iż-żmien mill-bidu ta' test sa akklimatazzjoni u/jew adattament tal-mikroorganizmi qed jiddegradaw ikun intlaħaq u l-grad ta' bijodegradazzjoni ta' kimika għall-ittestjar jew ta' materja organika jkun żdied sa livell li wiehed 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-tmien 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 tilhaq l-aqwa tagħha u l-kurva tal-bijodegradazzjoni tkun sabet il-livell tagħha.

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

▼ **M4***Appendiċi 2***Eżempju ta' kurva ta' bijodegradazzjoni***Figura 1***Bijodegradazzjoni ta' ottanol-1 fit-test ta' Spazju Fuq ta' CO₂ Glossarju**

Biodegradation:

Bijodegradazzjoni:

Fażi ta' degradazzjoni:

Livell massimu ta' bijodegradazzjoni:

Fażi ta' livell kostanti:

Perjodu ta' 10-d(jiem):

Žmien tat-test (jiem):

▼ M4

C.30. AKKUMULAZZJONI BIJOLOĠIKA TA' OLIGOCHAETES TERRESTRI

DAHLA

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 jsehh fl-ambjent, il-Koncentrazzjoni Bijoloġika: Test ta' Fluss Kontinwu tal-Hut (il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness (49)) u l-Akkumulazzjoni bijoloġika ta' Oligochaetes tal-Qiegh 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 hniex 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-hamrija, bħal eż. fid-Dokument ta' Gwida Teknika tal-UE (19). Il-htieġa ta' metodu ta' ttestjar speċifiku għal kompartment 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-hut, eż. (2) u (72). Metodu dwar il-kejl ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn hamrija kontaminata fi hniex (*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'hamrija mħallta għandu jtejjeb il-valutazzjoni tar-riskju ta' kimiċi f'ekosistemi terrestri eż. (25) (29).
 2. Invertebrati li jiddigerixxu l-hamrija huma esposti għal kimiċi li jkunu fil-hamrija. Fost dawn l-annimali, oligochaetes terrestri jaqdu rwol importanti fl-istruttura u l-funzjoni tal-hamrija (15) (20). Oligochaetes terrestri jgħixu fil-hamrija u parzjalment fil-wieċ tal-hamrija (l-aktar fis-saff taż-żibel); ta' sikwit jirrapprezentaw l-ispeċi l-aktar abbundanti f'termini ta' bijomassa (54). Bit-taqlib bijoloġiku tal-hamrija 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 Tossicità fil-Hamrija jew Akkumulazzjoni Bijoloġika bil-Hanex Lumbriċida *Eisenia fetida* u bil-Hanex 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-hamrija. Aktar dokumenti li ssir referenza għalihom f'dan il-Metodu ta' Ttestjar huma l-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness, Koncentrazzjoni Bijoloġika: Test ta' Fluss Kontinwu tal-Hut (49) u OECD TG 315: Akkumulazzjoni Bijoloġika f'Oligochates tal-Qiegh li jgħixu f'sediment (53). Esperjenza Prattika fi studji u pubblikazzjonijiet mil-letteratura dwar akkumulazzjoni bijoloġika ta' hamrija, 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-hamrija. Ittestjar għal akkumulazzjoni bijoloġika f'komposti metallorganiċi assoċjati mal-hamrija, stabbli, jista' jkun possibbli ma' dan il-Metodu ta' Ttestjar. Huwa wkoll applikabbli għal metalli u għal mikroelementi.
- PREREKWIŻIT
5. Testijiet biex titkejje l-akkumulazzjoni bijoloġika ta' kimika f'oligochaetes terrestri saru b'metalli tqal (ara eż. (63)) u b'kimiċi persistenti, organiċi li għandhom valuri log K_{ow} bejn 3.0 u 6.0 eż. (40). Testijiet bħal dawn japplikaw ukoll għal:

— kimiċi li juru log K_{ow} ta' aktar minn 6.0 (kimiċi superidrofobiċi);

▼ **M4**

- kimiċi li jappartienu lil klassi ta' kimiċi organiċi magħrufin li għandhom il-potenzjal jakkumulaw bijoloġikament f'organizmi haġġin, eż. kimiċi attivi fil-wieċ jew li jassorbixxu hafna;
 - 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 b'hal isem komuni, isem tal-kimika (preferibbilment isem IUPAC), formula strutturali, numru tar-registru tal-CAS, purezza, prekawżjonijiet ta' sikurezza, kondizzjonijiet ta' hżin 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 hamrija-ilma, espress b'hal K_{oc} ;
 - (d) pressjoni tal-fwar;
 - (e) degradabbiltà (eż. fil-hamrija, ilma);
 - (f) metaboliti magħrufin.
7. Jistgħu jintużaw kimiċi għall-ittestjar b'tikketa radju jew mhux b'tikketa radju. Izda biex l-analiżi tithaffef huwa rrakkomandat li tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketa radju. Id-deċizzjoni ssir abbażi tal-limiti ta' detezzjoni jew ta' rekwiżit biex jitkejlu kimika għall-ittestjar u metaboliti prinċipali. Jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketa radju u jitkejlu residwi radjuattivi totali, huwa importanti li r-residwi b'tikketa radju kemm fil-hamrija kif ukoll fl-organizmi tat-test ikunu kkaratterizzati għal perċentwali ta' kimika prinċipali tat-test u b'tikketa li ma jkunux prinċipali, eż. f'kampjuni meħudin fi stat regolari jew fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment, biex tithalla ssir kalkolazzjoni ta' fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika (BAF) għall-kimika prinċipali tat-test u għal metaboliti tal-hamrija ta' thassib (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 tikketa radju. Meta jitkejlu residwi radjuattivi totali (billi tingħadd xintillazzjoni likwida wara estrazzjoni, kombustjoni jew tahlil ta' tessuti), il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika jkun ibbażat fuq il-kimika prinċipali tat-test u tal-metaboliti. Il-kalkolazzjoni tal-BAF preferibbilment għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni tal-kimika prinċipali tat-test fl-organizmi u f'residwi radjuattivi totali. Sussegwentement, il-fattur ta' akkumulazzjoni bijotahamrija (BSAF), normalizzat għall-kontenut ta' lipidi ta' kontenut ta' dud u ta' karbonju organiku (OC) ta' hamrija għandu jkun ikkalkulat mill-BAF għal raġunijiet ta' tqabbil bejn riżultati minn testijiet differenti ta' akkumulazzjoni bijoloġika.
8. It-tossicità tal-kimika għall-ittestjar għall-ispeċijiet użati fit-test għandha tkun magħrufa, eż. konċentrazzjoni ta' effetti (EC_x) jew konċentrazzjoni letali (LC_x) għaž-żmien tal-fażi ta' assorbiment (eż. (19)). Il-konċentrazzjoni magħzula tal-kimika għall-ittestjar preferibbilment għandha tkun madwar 1 % ta' LC₅₀, asimptotika akuta tagħha, u mill-anqas għaxar darbiet aktar oghla mil-limitu tal-detezzjoni tagħha fil-hamrija bil-metodu analitiku użat. Jekk ikunu disponibbli, għandha tingħata preferenza lil valuri ta' tossicità derivati minn studji fit-tul dwar punti ta' tmiem subletali (51) (52). Jekk dejta b'hal din ma tkunx disponibbli, test għal tossicità akuta għandu jipprovdi informazzjoni utli (ara eż. (23)).

▼ M4

9. Metodu analitiku adatt ta' akkuratezza, preċiżjoni u sensittività magħrufa għall-kwantifikazzjoni tal-kimika fis-soluzzjonijiet tat-testijiet, fil-hamrija, u fil-materjal bijoloġiku għandu jkun disponibbli, flimkien ma' dettalji dwar thejji u hżin ta' kampjuni, kif ukoll skedi materjali ta' dejta ta' sikurezza. Limiti analitiċi ta' detezzjoni tal-oġġett tat-test fil-hamrija 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 tiffaċilita' analiżi, u l-konċentrazzjonijiet tat-test użati m'għandhomx jirriżultaw f'effetti tossiċi.
10. It-test jista' ssir b'hamrija artifiċjali jew b'hamrija naturali. Informazzjoni dwar karatteristiċi tal-hamrija naturali użata, eż. l-oriġni tal-hamrija jew il-kostitwenti tagħha, pH, kontenut ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (perċentwali ta' ramel, fajd u tafal), u kemm tkun kapaci' 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). Definizjonijiet 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-hamrija, 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-nieqes u l-kontenut ta' lipidi tal-organizmi tat-test. Dan jista' jsir billi jintuza dud tal-grupp ta' kontroll. Jistghu jinkisbu valuri ta' sfond analitiku (in blank) billi jkunu analizzati kampjuni tad-dud ta' kontroll u tal-hamrija. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud jiġi ttrasferit għal hamrija hielsa 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 tipprovdri informazzjoni dwar ir-rata li biha l-kimika għall-ittestjar tinħareġ 'il barra bħal ħmieġ mill-ġisem mill-organizmi 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 ibbazata 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, jittiehdu kejljiet ta' tehid ta' kampjuni sa 14-il jum (enchytraeids) jew 21 jum (hniex) sakemm jintlaħaq l-istat regolari (11) (12) (67). L-istat regolari jsehh meta grafika tal-konċentrazzjoni f'dud mal-hin tkun parallela mal-assi tal-hin, u tliet analiżi suċċessivi ta' konċentrazzjoni magħmulin fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' mill-anqas jumejn ma jvarjawx aktar minn $\pm 20\%$ wahda mill-oħra abbazi ta' tqabbiliet ta' statistika (eż. analiżi ta' varjanza, analiżi ta' rigressjoni).
14. Il-fażi ta' eliminazzjoni tikkonsisti fit-trasferiment tal-organizmi tat-test għal reċipjenti li jkun fihom l-istess substrat mingħajr il-kimika għall-ittestjar. Matul il-fażi ta' eliminazzjoni, jittiehdu kejljiet f'hinijiet ta' tehid ta' kampjuni matul 14-il jum (enchytraeids) jew 21 jum (hniex) 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

▼M4

eliminati. Il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika tal-istat regolari (BAFss) ikun ikkalkulat preferibbilment kemm bhala l-proporzjon tal-koncentrazzjoni f'dud (Ca) kif ukoll fil-hamrija (Cs) fi stat regolari apparenti, u bhala fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika, BAFK, bhala l-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' assorbiment mill-hamrija (ks) u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (ke) (ara l-Appendiċi 1 għal definizzjonijiet) jekk wiehded 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 wiehded minn dawn il-parametri jkunu kkalkulati minn ekwazzjonijiet mudelli kompjuterizzati (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' wiehded jindikaw idoneità) jew chi-kwadrat. Id-daqs ukoll tal-izball 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'raba mal-kontenut ta' lipidi u mal-kontenut ta' karbonju organiku (kg ta' karbonju organiku ta' hamrija (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-qiegh, 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-koncentrazzjoni 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 jitharsu 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-ghadd 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.

▼ **M4****Apparat**

19. Għandha tingħata attenzjoni biex ikun evitat l-użu ta' materjali, għall-partijiet kollha tat-tagħmir, li jistgħu jinħallu, jassorbixxu l-kimika għall-ittestjar jew ilissu kimiċi oħra, u jkollhom effett ħazin fuq l-animali tat-test. Reċipjenti standard rettangolari jew ċilindriċi, magħmulin minn materjal kimikament inert 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 mġhottijin kif jixraq biex id-dud ma jithallix jahrab, filwaqt li tithalla 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 jintuza (49). Ogġetti tat-test u kimiċi volatili b'tikketta radju m'għandhomx jithallew jaharbu. Għandhom ikunu użati sifuni (eż. flieksen tal-ħġieġ għal hasil bil-gass) li jkun fihom assorbenti adatti biex iżommu kull residwu milli jevapora mir-reċipjenti tat-test.

Hamrija

20. Il-hamrija tat-test għandha tkun ta' kwalità li tippermetti s-sopravivenza u preferibbilment ir-riproduzzjoni tal-organizmi 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 jhaffer toqob fil-hamrija.
21. Il-hamrija artifiċjali deskritta fil-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness (48) hija rakkomandata biex tintuza bħala s-substrat fit-testijiet. It-tnejn tal-hamrija artifiċjali għal użu fit-testijiet ta' akkumulazzjoni bijoloġika u rakkomandazzjonijiet għall-ħżin ta' hamrija artifiċjali jingħataw fl-Appendiċi 4. Hamrija artifiċjali mnixxa bl-arja tista' tinħażen f'temperatura ambjentali sakemm tintuza.
22. Izda hamrija naturali minn siti mhux imniġġsa tista' sservi ta' hamrija ta' test u/jew ta' kultura. Hamrija naturali għandha tkun ikkaratterizzata mill-anqas minn oriġni (sit ta' ġbir), pH, kontenut ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partikkel (percentwali ta' ramel, fajd u tafal), kapaċità ta' zamma massima ta' ilma (WHCmax), u kontenut ta' ilma f'percentwali (3). Analizi tal-hamrija jew tal-kostitwenti tagħha għal mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu għandha tipprovdi informazzjoni utli. Jekk tintuza hamrija minn għelieqi ta' art agrikola, m'għandhiex tkun giet ittrattata bi prodotti ta' protezzjoni ta' għelejjel jew b'demel ta' animali ttrattati bħala fertilizzanti għal mill-anqas sena u b'fertilizzanti organiċi għal mill-anqas sitt xhur qabel ma jittiehdu kampjuni (50). Proċeduri ta' manipolazzjoni għal hamrija naturali qabel ma tintuza f'tests ekotossikoloġiċi ma' oligochaetes fil-laboratorju huma deskritti fi (3). Għal hamrija naturali ż-żmien ta' ħżin fil-laboratorju għandu jinzamm qasir kemm jista' jkun.

Applikazzjoni tal-kimika għall-ittestjar

23. Il-kimika għall-ittestjar tkun inkorporata fil-hamrija. Għandhom jitqiesu l-proprietajiet fizikokimiċi tal-kimika għall-ittestjar. Kimika għall-ittestjar li tinħall fl-ilma għandha tiġi mahlula kompletament fl-ilma qabel ma tithallat mal-hamrija. Il-proċedura rakkomandata li tiffortifika għal kimika għall-ittestjar li f'it tinħall fl-ilma tinvolvi kisja waħda jew aktar tal-kostitwenti tal-hamrija (artifiċjali) mal-kimika għall-ittestjar. Pereżempju, ir-ramel tal-quartz, jew porzjon minnu, jista' jitghaddas b'soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar f'solvent organiku adatt, li wara jiġi evaporat bil-mod sakemm

▼ **M4**

jinxef. Il-frazzjoni miksija mbagħad tkun tista' tithallat fil-hamrija mxarrba. Il-vantaġġ kbir ta' din il-proċedura huwa li ebda solvent ma jiddaħhal fil-hamrija. Meta tintuża hamrija naturali, il-kimika għall-ittestjar tista' tkun iġġirata billi porzjon ta' hamrija miksija bl-arja jithallat kif deskritt hawn fuq għall-hamrija artifiċjali, jew billi l-kimika għall-ittestjar tithawwad fil-hamrija mxarrba, bi stadju wara ta' evaporazzjoni jekk jintuża aġent ta' solubilità. Ingenerali, il-kuntatt ta' hamrija 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 jithallat mal-ilma u/jew li jkun jista' jitneħħa (pereżempju, evaporat), u tithalla biss il-kimika għall-ittestjar fuq il-hamrija.

— Jekk jintuża kontroll ta' solvent, ma jkunx hemm hteġa ta' kontroll negattiv. Il-kontroll ta' solvent għandu jkun fih 'il fuq mill-ogħla konċentrazzjoni ta' solvent miżjud mal-hamrija u għandu juża solvent mill-istess lott użat biex issir is-soluzzjoni ta' stokkijiet. It-tossicità 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 f'it jinhallu fl-ilma u f'solventi organiċi, jistgħu jithalltu 2,0 – 2,5 g ta' ramel quartz mithun 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-tahlita ta' ramel tal-quartz u l-kimika għall-ittestjar jiżdiedu mal-hamrija magħmula niedja minn qabel u mħawda sewwa b'ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut meħtieġ ta' rtuba. It-tahlita finali titqassam fir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tittenna għal kull konċentrazzjoni tat-test, u jithejja wkoll kontroll xieraq b'2,0 – 2,5 g ta' ramel tal-quartz mithun fin għal kull reċipjent tat-test.

25. Il-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-hamrija għandha tkun iddeterminata wara li tkun giet iġġirata. Id-distribuzzjoni omogenja tal-kimika għall-ittestjar fil-hamrija għandha tkun iġġirata qabel ma jiddaħhlu l-organizmi tat-test. Il-metodu użat biex tkun iġġirata, u r-raġunijiet għall-għażla ta' proċedura li tiffortifika għandhom ikunu rrapportati (24).

26. L-ekwilibriju bejn il-hamrija u l-fażi ta' ilma mill-pori idealment għandha tkun stabbilita qabel ma jiżdiedu l-organizmi; huwa rrakkomandat perġodu ta' żmien ta' erbat ijiem f'20 °C. Għal hafna kimiċi organiċi li f'it jinhallu fl-ilma ż-żmien meħtieġ biex jintlaħaq ekwilibriju veru bejn frazzjonijiet sorbiti u mahlulin jistgħu jingħaddu f'jiem jew xhur. Ikun jiddependi mill-ghan tal-istudju, pereżempju meta l-kondizzjonijiet ambjentali għandhom ikunu imitati, jekk il-hamrija fortifikata tkunx tista' "tixxejjah" għal perġodu itwal, eż. tliet ġimgħat għal metalli f'20 °C (22).

Kultura għall-organizmi 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 hieles minn mard, anormalitajiet u parassiti osservabbli.

PRESTAZZJONI TAT-TEST

29. L-organizmi 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 (hniex) sakemm ma jintweriex li jkun intlaħaq stat regolari.

▼ M4

30. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud ikun ittrasferit għal hamrija ħielsa minn kimika għall-ittestjar. L-ewwel kampjun għandu jittiehed 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 hafna speċijiet ta' enchytraeids terrestri l-piż ta' kull waħda minnhom huwa baxx hafna (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-kejljiet tal-piż u l-analiżi kimika, jista' jkun meħtieġ li jingabar id-dud tar-riċipjenti replikati tat-test (jiġifieri jintuża d-dud kollu ta' riċipjent replikat biex jinkiseb riżultat ta' tessut analitiku wiehed), 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 oġġla ta' kull speċi waħidha (*Eisenia fetida* u *Eisenia andrei*), jistgħu jintużaw riċipjenti replikati li jkun fihom speċi waħda.
32. Il-hniex 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 wiehed u iehor 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). Minhabba li l-piż u l-età ta' annimal jista' jkollhom effett fuq il-valuri tal-BAF (eż. minhabba 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' hamrija ma' dud biex ikun imminimizzat it-tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-hamrija 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' hamrija għal kull dudu, u għal enchytraeids, minimu ta' 10-20 g d.w. ta' hamrija għal kull riċipjent tat-test. Ir-riċipjenti għandu jkun fihom saff hamrija ta' 2-3 cm (enchytraeids) jew 4-5 cm (hniex).
34. Id-dud użat f'test jitneħħa mill-kultura (eż. enchytraeids billi jintużaw pinzetti ta' ġojjellier). Annimali adulti jkunu ttrasferiti għal hamrija 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-hniex jitlahalhu billi jkunu ttrasferiti għal dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet Petri) li jkun fihom ilma nadif, u wara jintiżnu qabel ma jiżdiedu mal-hamrija 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 jinxfi bl-użu ta' xugaman tal-karta ftiit niedi.
35. Il-mod kif organismi tat-test iħaffru toqob għandu jkun osservat u rreġistrat. F'testijiet bi hniex, l-annimali (kontroll u trattamenti) normalment itaqqu toqob fil-hamrija f'perjodu ta' ftiit sigħat; dan għandu jkun ivverifikat mhux aktar tard minn 24 siegħa wara li jiżdied id-dud fir-riċipjenti tat-test. Jekk il-hniex jonqsu milli jħaffru toqob fil-hamrija (eż. aktar minn 10 % għal aktar

▼ **M4**

min-nofs tal-faži ta' assorbiment), dan jindika li jew il-kondizzjonijiet tat-test ma jkunux adatti jew li l-organizmi tat-test ma jkunux f'saħħithom. F'każ bhal 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 jhaffru toqob u dawk li ma jhaffrux toqob tkun preżunta li hija ekwivalenti u enchytraeids li ma jhaffrux toqob mhux bilfors jehtigilhom li t-test jittenna.

Tmigh

36. Tmigh għandu jkun ipprospettat meta tintuża ħamrija b'kontenut ta' karbonju organiku totali baxx. Meta tintuża ħamrija artifiċjali, hija rrakkomandata rata ta' tmigh darbtejn fil-gimgha (jiġifieri d-dud għandu jintema' darba fil-gimgha) ta' 7 mg ta' rawt niexef għal kull g ħamrija piż fin-niexef għal ħniex, u rata kull gimgha ta' 2-2,5 mg ta' trofof ta' ħafur mithun għal kull g ħamrija piż fin-niexef għal enchytraeids (11). L-ewwel razżjon ta' ikel għandu jithallat mal-ħamrija minnufih qabel ma' jiżdiedu l-organizmi tat-test. Preferibbilment għandu jintuża l-istess tip ta' ikel bhal 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 konċentrazzjonijiet(jiet) addizzjonali tkun/ikunu meħtieġa għandhom ikunu ġġustifikati. Jekk it-tossicità (EC_x) tal-kimika għall-ittestjar tkun qrib il-limitu ta' detezzjoni analitika, huwa rrakkomandat l-użu ta' kimika għall-ittestjar b'tikketta radju b'radjuatività speċifika għolja. Għal metalli, il-konċentrazzjoni għandha tkun 'il fuq mil-livell tal-isfond fit-tessut u fil-ħamrija.

Replikati

39. Għal kejljiet kinetiċi (faži ta' assorbiment u eliminazzjoni), l-għadd minimu ta' reċipjenti replikati ttrattati għandu jkun tlieta għal kull punt ta' teħid ta' kampjuni. L-għadd totali ta' replikati mhejjija għandu jkun suffiċjenti biex ikopri l-hinijiet kollha ta' teħid ta' kampjuni matul l-assorbiment u l-faži 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 (erbgha li jkun itteħdilhom kampjun fil-bidu, erbgha fit-tmiem ta' assorbiment, u erbgha 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 (erbgha reċipjenti replikati għandu jitteħdilhom kampjun fil-bidu, erbgha fit-tmiem tal-faži ta' assorbiment u erbgha fit-tmiem tal-faži ta' eliminazzjoni) li jkun fih il-kostitwenti kollha hlief għal oġġett tat-test flimkien mar-replikati ttrattati. F'dan il-każ, jistgħu wkoll ikunu pprovduti erbgha reċipjenti replikati addizzjonali ta' kontroll negattiv (ebda solvent) għal teħid fakultattiv ta' kampjuni fit-tmiem tal-faži 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-organizmi tat-test. Huwa rrakkomandat li jkun stabbilit għadd suffiċjenti ta' reċipjenti replikati riżervati addizzjonali (eż. tmienja) għal trattament u kontroll(i).

▼ M4

Frekwenza ta' kejl tal-kwalità tal-hamrija

41. Il-pH tal-hamrija, il-kontenut ta' rtuba fil-hamrija u t-temperatura (kontinwament) fil-kamra tat-test għandhom jitkejlu fil-bidu u fit-tmiem tal-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni. Darba fil-gimgha l-kontenut ta' rtuba fil-hamrija 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.

Tehid ta' kampjuni u analiżi ta' dud u ta' hamrija

42. Eżempju ta' skeda għall-fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni f'testijiet ta' akkumulazzjoni bijoloġika ta' hniex u enchytraeid tinghata fl-Appendiċi 3.
43. Il-hamrija jittehdilha kampjun mir-reċipjenti tat-test biex tkun iddeterminata l-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar qabel ma jiddaħhal 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-hamrija. Ingenerali, konċentrazzjonijiet totali ta' hamrija 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 inkluzi fir-rapport.
44. Id-dud u l-hamrija jittehdulhom 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-hamrija 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-hamrija mkejla fit-tmiem tal-fażi ta' assorbiment tmur lil hinn mill-konċentrazzjoni tal-bidu b'aktar minn 30 %, il-kampjuni tal-hamrija meħudin f'dati oħra wkoll għandhom ikunu analizzati.
45. Nehhi d-dud ta' replikat partikolari mill-hamrija f'kull hin ta' tehid ta' kampjuni (eż. wara li tkun ferrixt il-hamrija tar-replikati f'dixx baxx u erfajt id-dud bl-użu ta' pinzetti rotob tal-ġojjellier), lahlahhom malajr bl-ilma f'dixx baxx tal-ħġieġ jew tal-azzar. Nehhi ilma żejjed (ara l-paragrafu 34). Ilttrasferixxi d-dud b'attenzjoni għal go reċipjent li jkun intiżen minn qabel, iżinhom fil-pront, inkluz il-kontenut tal-imsaren.
46. Il-hniex (*Eisenia* sp.) għandhom imbagħad jithallew inadddu msarinhom matul l-lejl eż. fuq filtru niedi tal-karta f'dixx Petri mghotti (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' tessuti ta' Enchytraeids isir mingħajr tindif, għax dan huwa teknikament diffiċli minhabba 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 taht -18 °C).
47. Matul il-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud jissostitwixxi kontenut ta' msaren kontaminati b'hamrija nadifa. Dan ifisser li kejljiet ta' dud mhux nadif (enchytraeids f'dan il-kuntest) li jkun ittehdilu kampjun minnufih qabel il-fażi ta' eliminazzjoni jinkludi hamrija 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 hniex 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'hamrija mhux kontaminata matul l-fażi ta' eliminazzjoni, il-piż tal-kontenut ta' msaren jista' jkun stmat mill-piż ta' dud fl-imxarrab/piż ta' rmied ta' dud jew piż ta' dud fin-niexef/proporzjonijiet ta' piżijiet ta' rmied tad-dud.

▼ M4

48. Il-kampjuni tal-hamrija u d-dud għandhom preferibbilment ikunu analizzati minnufih wara tnehhija (jiġifieri f'1-2 ijiem) biex ma jithallix 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-frizja ($\leq -18^{\circ}\text{C}$).
49. Għandu jkun ivverifikat li l-precizjoni u riproducibbiltà tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tal-kimika għall-ittestjar mill-hamrija 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-riċipjenti ta' kontroll f'koncentrazzjonijiet oġġla minn ta' sfond. Meta l-koncentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fl-organiżmu tat-test Ca tkun > 0 fid-dud ta' kontroll, din għandha tkun inkluża fil-kalkulazzjoni tal-parametri kinetici (ara l-Appendiċi 2). Il-kampjuni kollha għandhom ikunu ttrattati matul it-test kollu biex ikunu mminimizzati l-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirrizultaw 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 tipprovi informazzjoni importanti. Il-kampjuni għandhom imbagħad "jitnaddfu" biex il-kimika prinċipali tat-test tkun tista' tigi kkwantifikata separatament. Jekk metabolita waħedha taqbeż 10 % tar-radjuattività totali fil-kampjun(i) analizzat(i), hija rrakkomandata l-identifikazzjoni ta' dawn il-metaboliti.
51. L-irkupru globali, u l-irkupru ta' kimika għall-ittestjar f'dud, fil-hamrija, 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' dawġ li jittehdilhom kampjun minn riċipjent partikolari tat-test huwa aċċettabbli għal dud enchytraeid li jkunu iżgħar mill-hniex. 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' riċipjenti 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' piz totali fin-nieġef, kif ukoll, meta meħtieġ (jiġifieri għal kimiċi idrofobiċi hafna), 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. Izda biex ikun evitat l-użu ta' solventi bil-klorur, għandha tintuża modifika tal-metodu ta' Bligh u Dyer (9) kif deskritta fi (17). Minhabba 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, minhabba li l-lipidi sikwit ikollhom jitnehhew mill-estratt qabel ma jkunu jistgħu jiġu analizzati kromatografikament (49). Alternattivament, jistgħu jintużaw animali ta' kontroll biex jitkejjel il-kontenut ta' lipidi, li mbagħad ikunu jistgħu jintużaw biex jinnormalizzaw valuri tal-BAF. Dan l-aħħar approċċ inaqqas il-kontaminazzjoni ta' tagħmir mal-kimika għall-ittestjar.

▼ **M4****DEJTA U RAPPURTAR****Trattament ta' riżultati**

54. Il-kurva ta' assorbiment tal-kimika għall-ittestjar tinkiseb billi l-konċentrazzjoni tagħha tiġi mmarkata fi/fuq id-dud matul il-fażi ta' assorbiment mal-ħin fuq skala aritmetiċi. Meta l-kurva tkun laħqet livell kostanti jew stat regolari (ara d-definizzjonijiet fl-Appendiċi 1), il-fattur BAF_{ss} 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-organizmu tat-test

C_s huwa l-konċentrazzjoni ta' kimika għall-ittestjar fil-hamrija

55. Meta ma jintlaħaq ebda stat regolari, il-BAFK, ibbażat fuq il-kostanti ta' rati, għandu jkun ikkalkulat minflok il-BAF_{ss}, 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 (jigifieri 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. EC₅₀, LC₅₀, NOEC) tal-kimika għall-ittestjar għal oligochaetes li jghixu fil-hamrija;
- purezza, natura fizika u proprjetajiet fizikokimiċi, eż. log K_{ow}, solubilità tal-ilma;
- dejta ta' identifikazzjoni ta' kimiċi; sors tal-oġġett tat-test, identità u konċentrazzjoni ta' kull solvent użat;
- jekk tintuża kimika għall-ittestjar b'tikketta radju, il-pożizzjoni preċiża tal-atomi bit-tikketta, ir-radjuattività speċifika u l-purezza radjukimika.

Speċi tat-test:

- isem xjentifiku, razza, sors, kull trattament minn qabel, akklimatazzjoni, età, daqs-firxa, eċċ..

▼ M4

Kondizzjonijiet tat-test:

- proċedura tat-test użat;
- tip u karatteristiċi ta' l-luminazzjoni użati u fotoperjodu/i;
- disinn tat-test (eż. għadd u daqs ta' reċipjenti tat-test, massa ta' hamrija u għoli ta' saff ta' hamrija, għadd ta' replikati, għadd ta' dud għal kull replikat, għadd ta' konċentrazzjonijiet tat-test, durata ta' fażijiet ta' assorbiment u eliminazzjoni, frekwenza ta' tehid ta' kampjuni);
- motiv għall-għażla tal-materjal tar-reċipjent tat-test;
- metodu ta' thejjija 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-hamrija artifiċjali jew – jekk jintużaw midja naturali – l-oġġetti tal-hamrija, deskrizzjoni ta' kull trattament minn qabel, riżultati tal-kontrolli (sopravivenza, żvilupp ta' bijomassa, riproduzzjoni), karatteristiċi tal-hamrija (pH, kontenut totali ta' karbonju organiku, distribuzzjoni ta' daqsijiet ta' partiċelli (percentwali ta' ramel, fajd u tafal)), WHC_{max} , kontenut ta' ilma f'percentwali fil-bidu u fit-tmiem tat-test, u kejljiet oħra magħmulin);
- informazzjoni dettaljata dwar it-trattament ta' kampjuni tal-hamrija u ta' dud, inklużi dettalji dwar thejjija, ħzin, proċeduri ta' fortifikazzjoni, estrazzjoni u proċeduri analitiċi (u preċiżjoni) għall-oġġett tat-test f'dud u fil-hamrija, 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' hamrija, nuqqas ta' riproduzzjoni f'test ta' akkumulazzjoni bijoloġika b'enchytraeids);
- il-proporzjon ta' piż fin-niexef għal piż fl-imxarrab tal-hamrija u l-organizmi tat-test (utli għal normalizzazzjoni);
- il-piżijiet fl-imxarrab tad-dud waqt li jkunu qed jittiehdu kampjuni; għal ħniex, il-piżijiet fl-imxarrab fil-bidu tat-test u f'kull żmien ta' tehid ta' kampjuni qabel u wara tindif ta' msaren;
- il-kontenut ta' lipidi tal-organizmi tat-test (jekk determinati);
- kurvi, li juru l-kinetika ta' assorbiment u eliminazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fid-dud, u z-żmien għal stat regolari;
- C_a u C_s (b'devjazzjoni u firxa standard, jekk ikun jixraq) għaż-żmijiet kollha ta' tehid 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' hamrija). Jekk ikun meħtieġ fattur ta' akkumulazzjoni bijota-hamrija (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-organizmu, u C_s tista' tkun espressa bħala g kg^{-1} ta' karbonju organiku (OC) tal-hamrija;
- BAF (espress f'kg ta' hamrija kg^{-1} ta' dud), kostant k_s tar-rata ta' assorbiment ta' hamrija (espress f'g ta' kg^{-1} ta' hamrija ta' jum $^{-1}$ ta' dud), u kostant k_e tar-rata ta' eliminazzjoni (espressa f'jum $^{-1}$); BSAF (espress f'kg ta' hamrija ta' OC kg^{-1} kontenut ta' lipidi ta' dud) jistgħu jkunu rrapportati addizzjonalment;

▼ **M4**

— jekk imkejjel: perċentwali ta' kimika prinċipali, metaboliti, u residwi magħqudin (jiġifieri l-perċentwali ta' kimika għall-ittestjar li ma tistax tkun estratta b'metodi komuni ta' estrazzjoni) misjuba fil-hamrija u annimali tat-test;

— metodi użati għall-analizi 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. Physiol. 37: 911-917.
- (10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.
- (11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.
- (13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

- (14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.
- (17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1 000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tal-18 ta' Diċembru 2006 dwar ir-registrazzjoni, 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 jhassar 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 Oligochaetes*, 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' jitnizzel 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 Canada (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.

▼ M4

- (29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.
- (31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.
- (32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-träger, 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 ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-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 variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

- (47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossicità għal Hniox
- (49) Il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness: Konċentrazzjoni bijoloġika: flow-through fish test.
- (50) Il-Kapitolu C.21 ta' dan l-Anness: Mikroorganizmi tal-Hamrija: 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 Oligochaetes, 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-Koeffizienten 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 Bioakkumulations-tests 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, Efrogmson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93-100.

▼M4

- (66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.
- (68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology*. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: *Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- (77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161-165.
- (78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.

▼ **M4***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Akkumulazzjoni bijoloġika hija ż-żieda f'konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fi jew fuq organiżmu relattiv għall-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar. Riżultati ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn proċessi kemm ta' konċentrazzjoni bijoloġika kif ukoll ta' tkabbir bijoloġiku (ara hawn taht).

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-wieċ tal-ġisem u hamrija li tkun iddahhlet), 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 elettronici 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 jsehhu 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 $g \cdot kg^{-1}$ piż fin-niexef tad-dudu) diviż bil-konċentrazzjoni tal-kimika fil-midjum tal-madwar (C_s bhala $g \cdot kg^{-1}$ tal-piż fin-niexef tal-hamrija); il-BAF għandu l-unitajiet ta' $kg \text{ hamrija} \cdot kg^{-1}$ dudu.

Il-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika ta' stat regolari (BAF_{ss}) huwa l-BAF fi stat regolari u ma jitbiddilx b'mod sinifikanti tul perjodu prolongat ta' żmien, bil-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-midjum tal-madwar (C_s bhala $g \cdot kg^{-1}$ tal-piż fin-niexef tal-hamrija) tkun kostanti matul dan il-perjodu ta' żmien.

Fatturi ta' akkumulazzjoni bijoloġika kkalkulati direttament mill-proporzjon tal-kostant tar-rata ta' assorbiment ta' hamrija u l-kostant tar-rata ta' eliminazzjoni (k_s u k_e , ara hawn taht) jissejhu fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika kinetika (BAF_K).

Il-fattur ta' akkumulazzjoni bijota-hamrija (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-hamrija fi stat regolari. C_a huwa mbagħad espress bhala kontenut ta' lipidi $g \cdot kg^{-1}$ tal-organiżmu, u C_s bhala kontenut organiku $g \cdot kg^{-1}$ tal-hamrija; il-BSAF għandu l-unitajiet ta' lipidi $kg \text{ OC} \cdot kg^{-1}$.

Livell kostanti jew stat regolari huwa ddefinit bhala l-ekwilibriju bejn il-proċessi ta' assorbiment u ta' eliminazzjoni li jsehh fl-istess waqt matul il-fażi ta' espożizzjoni. L-istat regolari jintlahaq fil-grafika ta' BAF mal-hin meta l-kurva tiġi parallela mal-assi tal-hin u tliet analizi ta' BAF wara xulxin magħmulin fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' mill-anqas jumejn ikunu qrib 20 % wahda mill-oħra, u ma jkunx hemm differenzi sinifikanti ta' statistika fost it-tliet perjodi ta' tehid 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' hamrija 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 bhala P_{ow} . Il-logaritmu ta' K_{ow} ($\log K_{ow}$) jintuża bhala indikazzjoni tal-potenzjal ta' kimika għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organiżmi akwatiċi.

▼M4

Il-faži ta' assorbiment jew ta' espożizzjoni hija l-hin li matulu l-organizmi tat-test ikunu esposti għall-kimika għall-ittestjar.

Il-kostant tar-rata ta' assorbiment ta' hamrija (k_s) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' zieda fil-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fi/fuq l-organizmu tat-test li jirrizulta minn assorbiment mill-faži tal-hamrija. k_s huwa espress f'g hamrija kg^{-1} ta' dudu d^{-1} .

Il-faži ta' eliminazzjoni hija l-hin, wara t-trasferiment tal-organizmi tat-test minn midjum kontaminat għal midjum hieles mill-oġġett tat-test, li matulha tkun studjata l-eliminazzjoni (jew it-telf nett) tal-kimika mill-organizmi 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-organizmu tat-test, wara t-trasferiment tal-organizmi tat-test minn midjum li jkun fih l-oġġett tat-test għal midjum hieles minn kimiċi; k_e hija espressa f' d^{-1} .

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

▼ **M4***Appendiċi 2***Kalkulazzjoni ta' parametri ta' assorbiment u eliminazzjoni**

Il-punt ta' tmiem ewlieni ta' test ta' akkumulazzjoni bijoloġika huwa l-fattur ta' akkumulazzjoni bijoloġika, BAF. Il-BAF imkejjel jista' jiġi kkalkulat bid-diviżjoni tal-konċentrazzjoni fl-organizmu tat-test, C_a , bil-konċentrazzjoni fil-hamrija, 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' hamrija (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' hin u l-ekwazzjonijiet mudell:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ekwazzjoni 1}]$$

jew

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ekwazzjoni 2}]$$

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 hamrija kg⁻¹ ta' dudu d⁻¹]

C_s = konċentrazzjoni ta' kimika fil-hamrija [g kg⁻¹ ta' piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_e = kostant tar-rata ta' eliminazzjoni [d⁻¹]

t_c = hin 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:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ekwazzjoni 3}]$$

u

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ekwazzjoni 4}]$$

F'każijiet fejn ikun osservat tnaqqis sinifikanti tal-konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar fil-hamrija tul il-hin matul il-fażi ta' assorbiment, jistgħu pereżempju jintużaw il-mudelli li ġejjin (67) (79):

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

▼ **M4**

fejn:

C_s = konċentrazzjoni ta' kimika fil-ħamrija [g kg-1 piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

k_0 = kostant ta' rata ta' degradazzjoni fil-ħamrija [d-1]

C_0 = konċentrazzjoni inizjali tal-kimika fil-ħamrija [g kg-1 ta' piż fl-imxarrab jew fin-niexef]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ekwazzjoni 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{ekwazzjoni 7}]$$

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 = hin fit-tmiem tal-faži ta' assorbiment,

Meta jintlaħaq stat regolari matul il-faži ta' assorbiment (jiġifieri $t = \infty$), ekwazzjoni 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ekwazzjoni 1}]$$

tista' titnaqqas għal:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

jew

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{ekwazzjoni 8}]$$

F'liema każ $k_s/k_e \times C_s$ 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:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{ekwazzjoni 9}]$$

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 mehudin 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-faži 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-hin jindikaw tnaqqis esponenzjali kostanti tal-konċentrazzjoni tal-oġġett tat-test fl-animali, ikun jista' jintuza mudell ta' kompartment wiehed (ekwazzjoni 9) biex jiddeskrivi l-perkors tal-hin ta' eliminazzjoni.

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

▼ **M4**

Proċessi ta' eliminazzjoni xi drabi jidhru li jkunu ta' żewġ fażijiet, li juru tnaqqis mgħaġġel ta' C_a matul il-fażijiet bikrija, li jinbidel għal telf aktar bil-mod ta' oġġetti tat-test fil-fażijiet ta' wara tal-eliminazzjoni, eż. (27) (68). Iz-żewġ fażijiet jistgħu jkunu interpretati billi wiehed jassumi li jkun hemm żewġ kompartimenti differenti fl-organizmu, li minuu l-oġġetti 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 kongunta bħal din ta' kostanti ta' rata ta' assorbiment u eliminazzjoni, jistgħu jkunu kkonsultati r-referenzi, (181), (213) u (210).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{ekwazzjoni 11}]$$

Nota: Meta parametri ta' assorbiment u eliminazzjoni jkunu stmati fl-istess waqt mid-dejta kongunta ta' assorbiment u eliminazzjoni, "m" kif tidher fl-ekwazzjoni 11 hija deskritttriċi li thalli 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) isehhu matul it-test (ara eż. (79)).

▼ M4

Appendiċi 3

EŻEMPJI TA' SKEDI GHAL TESTIJET TA' AKKUMULAZZJONI BIJOLO-
ĠIKA TA' HAMRIJA

Test tal-hniex

- (a) Fażi ta' espożizzjoni bi 8 dati ta' teħid ta' kampjuni użati għal kalkulazzjoni ta' kinetika

Jum	Attività
– 6	Kondizzjonament tal-hamrija mhejjija għal 48 siegħa;
– 4	Il-frazzjoni tal-hamrija li tkun iffortifikata mas-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar; evaporizzazzjoni ta' kull solvent; tahlit tal-kostitwenti tal-hamrija; distribuzzjoni tal-hamrija mar-reċipjenti tat-test; ekwilibrazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 jiem (3 ġimgħat għal hamrija fortifikata bil-metall);
– 3 sa – 1	Separazzjoni tal-organizmi tat-test mill-kultura għal akklimatazzjoni; thejjija u rtib tal-kostitwenti tal-hamrija;
0	Kejl tat-temperatura, u l-pH tal-hamrija; tnehhija ta' kampjuni tal-hamrija minn reċipjenti ttrattati u kontroll ta' solventi għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar; zieda ta' razzjon ta' ikel; użin u distribuzzjoni każwali tad-dud fir-reċipjenti tal-hniex; zamma 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-hamrija; kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tkun magħluqa tintuża s-sistema tat-test;
1	Kontroll tal-provvista tal-arja, registrazzjoni ta' x'jagħmlu d-dud u t-temperatura; teħid ta' kampjuni tal-hamrija 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; zieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-hamrija 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; zieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-hamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
15 - 16	L-istess bħal jum 3;
17	L-istess bħal jum 1;
18 - 20	L-istess bħal jum 3;

▼ M4

Jum	Attività
21	L-istess bhal jum 1; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-gdid ir-reċipjenti tat-test; tmiem ta' fażi ta' espożizzjoni; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal go 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-proprietajiet 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	Thejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija; kondizzjonament tal-ħamrija mhejjija għal 48 siegħa;
– 4	Tahlit 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; zieda ta' razzjon ta' ikel; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal go 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 bhal jum 1;
3	Kontroll tal-provvista tal-arja, x'jagħmlu d-dud u t-temperatura;
4	L-istess bhal jum 1;
5 - 6	L-istess bhal jum 3;
7	L-istess bhal jum 1; zieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-gdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
8 - 9	L-istess bhal jum 3;
10	L-istess bhal jum 1;
11 - 13	L-istess bhal jum 3;
14	L-istess bhal jum 1; zieda ta' razzjon ta' ikel; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-gdid ir-reċipjenti tat-test u kkumpensa għall-ilma evaporat;
15 - 16	L-istess bhal jum 3;
17	L-istess bhal jum 1;

▼ **M4**

Jum	Attività
18 - 20	L-istess bħal jum 3;
21	L-istess bħal jum 1; kejl tat-temperatura u l-pH tal-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test; tehid ta' kampjuni ta' ħamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Thejjija 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' tehid ta' kampjuni użati għal kalkulazzjoni ta' kinetika

Jum	Attività
- 6	Kondizzjonament tal-ħamrija mhejjija għal 48 siegħa;
- 4	Il-frazzjoni tal-ħamrija li tkun iffortifikata mas-soluzzjoni tal-kimika għall-ittestjar; evaporizzazzjoni ta' kull solvent; tahlit tal-kostitwenti tal-ħamrija; distribuzzjoni tal-ħamrija mar-reċipjenti tat-test; ekwilibrazzjoni f'kondizzjonijiet tat-test għal 4 ijiem (3 ġimghat għal ħamrija fortifikata bil-metall);
- 3 sa - 1	Separazzjoni tal-organizmi tat-test mill-kultura għal akklimatazzjoni; thejjija u rtib tal-kostitwenti tal-ħamrija;
0	Kejl tat-temperatura, u l-pH tal-ħamrija; tnehhija ta' kampjuni tal-ħamrija minn reċipjenti ttrattati u kontroll ta' solventi għal determinazzjoni ta' konċentrazzjoni tal-kimika għall-ittestjar; zieda 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-nixef, 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; tehid 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; zieda ta' razzjon ta' ikel għall-ħamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-ħamrija billi tiżen mill-ġdid ir-reċipjenti tat-test u kkompensa għall-ilma evaporat;
9	L-istess bħal jum 1;
10	L-istess bħal jum 3;

▼ **M4**

Jum	Attività
11	L-istess bhal jum 1;
12 - 13	L-istess bhal jum 3;
14	L-istess bhal jum 1; zieda ta' razzjon ta' ikel għall-hamrija; kejl tat-temperatura u l-pH tal-hamrija; ikkontrolla l-irtuba tal-hamrija billi tiżen mill-gdid ir-reċipjenti tat-test; tmiem ta' fażi ta' espożizzjoni; ittrasferixxi d-dud mir-replikati esposti li jifdal għal go reċipjenti li jkun fihom hamrija nadifa għal fażi ta' eliminazzjoni (ebda tindif ta' msaren); tehid ta' kampjuni ta' hamrija u ta' dud minn kontrolli ta' solventi.
	Attivitajiet ta' espożizzjoni minn qabel (fażi ta' ekwilibrazzjoni) għandhom ikunu skedati, meqjusin il-proprietajiet tal-kimika għall-ittestjar.
	Attivitajiet deskritti għal jum 3 għandhom isiru kuljum (mill-anqas fil-jiem tax-xogħol).

▼ M4

Appendiċi 4

Hamrija artifiċjali – rakkomandazzjonijiet dwar thejġija u ħżin

Minhabba li hamrija naturali minn sors partikolari tista' ma tkunx disponibbli s-sena kollha, u organiżmi indigeni, kif ukoll il-preżenza ta' mikrosustanzi li jniġġsu jistgħu jinfluenzaw it-test, huwa rakkomandat substrat artifiċjali, il-hamrija artifiċjali skont il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness: Tossicità għal Hniex (48) biex jintuża f'dan it-test. Diversi speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu haġġin, jikbru u jirriproduċu f'din il-hamrija, u hija pprovduta standardizzazzjoni massima, kif ukoll komparabbiltà f'laboratorji u bejniethom ta' kondizzjonijiet tat-test u ta' kultura.

Hamrija 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-hamrija artifiċjali jista' jitnaqqas, eż. billi jitnaqqas il-kontenut tal-pit għal 4-5 % ta' hamrija xotta u jiżdied il-kontenut ta' ramel b'dan il-mod. Bi tnaqqis b'hal dan f'kontenut ta' karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' sorbiment ta' kimika għall-ittestjar mill-hamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tal-kimika għall-ittestjar għad-dud tista' tiżdied (74). Intwera li *Enchytraeus albidus* u *Eisenia fetida* jistgħu jkun qablu mal-kriterji ta' validità dwar riproduzzjoni meta ttestjati f'hamrija ta' għelieqi b'kontenut baxx ta' karbonju organiku, eż. 2,7 % (33), (201), u mill-esperjenza dan jista' jinkiseb f'hamrija artifiċjali b'5 % pit.

Thejġija

Il-kostitwenti nixfin tal-hamrija jithalltu sewwa (eż. f'mikser ta' skala kbira f'laboratorju). Dan għandu jsir xi ġimgha qabel ma jinbada t-test. Il-kostitwenti nixfin imhalltin tal-hamrija għandhom jitrattbu b'ilha dejonizzat mill-anqas 48 siegħa qabel l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test biex l-aċidità tiġi ekwibrata/stabilizzata. Għad-determinazzjoni ta' pH tintuża tahlita ta' hamrija u 1 M KCl fi proporzjon ta' 1:5. Jekk il-valur pH ma jkunx fil-firxa meħtieġa ($6,0 \pm 0,5$), jiżdied ammont suffiċjenti ta' CaCO₃ fil-hamrija, jew jithejja lott ġdid ta' hamrija.

Il-kapaċità massima għal zamma ta' ilma (WHC) tal-hamrija artifiċjali tiġi ddeterminata skont ISO 11268-2 (35). Mill-anqas jumejn qabel ma jinbada t-test, il-hamrija artifiċjali xotta titrattab billi jiżdied ilma biżżejjed dejonizzat jew rikostitwit biex jinkiseb bejn wiehied 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-hamrija 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-htigijiet tal-ispeċi (il-kontenut ta' rtuba jista' jkun iċċekkjat kif ġej: meta l-hamrija tinghafas bil-mod fl-idejn, għandhom johorġu qtar zgħir bejn is-swaba).

▼ M4**Hzin**

Il-kostitwenti nixfin tal-hamrija artifiċjali jistghu jinhażnu f'temperatura ambjentali sakemm jibdew jintużaw. Il-hamrija mhejjija u mrattba minn qabel tista' tinhażen f'post frisk sa tliet ijiem qabel ma tkun iffortifikata; wiehed ghandu joqgħod attent li jara li l-evaporazzjoni tal-ilma tkun mill-anqas. Hamrija fortifikata bl-oġġett tat-test għandha tkun użata minnufih sakemm ma jkunx hemm informazzjoni li turi li l-hamrija partikolari tkun tista' tinhażen minghajr ma jintlaqtu t-tossicità u d-disponibbiltà bijoloġika tal-oġġett tat-test. Kampjuni ta' hamrija fortifikata jistghu mbagħad jinhażnu skont il-kondizzjonijiet irrakkomandati għall-oġġett tat-test partikolari sakemm issir analizi.

▼ M4

Appendiċi 5

Speċi ta' oligochaetes terrestri rrakkomandat għall-ittestjar ta' akkumulazzjoni bijoloġika minn hamrija**Hniex**

L-ispeċi tat-test irrakkomandata hija *Eisenia fetida* (Savigny 1826), li hija tal-familja Lumbricidae. Mill-1972 'il hawn tinqasam f'żewġ subspeċi (*Eisenia fetida* u *Eisenia andrei* (10)). Skont Jaenike (36), huma mhumix speċi veri, separati. *Eisenia fetida* tingharaf malajr mill-faxex ta' lewn isfar jgħajjat inter-segmentali tagħha, filwaqt li *Eisenia andrei* hija ta' lewn aħmar uniformi, skur. Aktarx joriginaw mir-reġjun tal-Baħar l-Iswed, illum huma mifruxin mad-dinja kollha, l-aktar f'habitats immodifikati antropogenikament 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 lixxa għall-hut. MQabbli ma' dud oħra tal-hamrija ta' lumbrici, iċ-ċiklu ta' hajjithom huwa qasir u jimmaturaw f'madwar 2 – 3 xhur (f'temperatura ambjentali). L-aħjar temperatura għalihom hija bejn wiehied u iehor 20 – 24 C. Jippreferu substrati relattivament niedja b'pH kważi newtrali u b'kontenut kbir ta' materjal organiku. Minhabba li dawn l-ispeċijiet intużaw hafna 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' tahlita 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' melh) u m'għandux ikun ikkontaminat b'mod eċċessiv b'ammonja jew b'awrina tal-annimali. Tista' tintuża wkoll hamrija kummerċjali għal xogħol tal-ġnien hielsa minn addittivi, jew hamrija artifiċjali skont l-OECD (48), jew tahlita 50:50 tat-tnejn. Is-substrat għandu jkun niedi iżda mhux imxarrab hafna. Kaxex għat-trobbija ta' volum ta' minn 10 litri sa 50 litru jkun tajbin.

Biex jinkiseb dud ta' età u massa standard, l-aħjar hu li l-kultura tinbeda b'fosdqiet. Għalhekk, dud adult jidied f'kaxxa għat-trobbija li jkun fiha substrat frisk biex jipproduċi fosdqiet. L-esperjenza Prattika wriet li kwantità densa ta' bejn wiehied u iehor 100 dudu adult għal kull kg substrat (piż fl-imxarrab) twassal għal rati ta' riproduzzjoni tajbin. Wara 28 jum id-dud adult jitneħħa. Il-hniex li jfaqqsu mill-fosdqiet jintużaw għall-ittestjar meta jkun 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 jiċċaqilaq fis-substrat, ma jippruvax jitlaq mis-substrat u jirriproduċi kontinwament. Ċaqliq bil-mod hafna jew tarf tal-warrani isfar (fil-każ ta' *Eisenia fetida*) jindikaw substrat eżawrit. F'dan il-każ, huwa rrakkomandat substrat gdid u/jew għadd iżgħar ta' annimali għal kull kaxxa.

Referenzi magħzula addizzjonali

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Land-wirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼ M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchytraeids

L-ispeċi tat-test irrakkomandata hija *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (hanex abjad). *Enchytraeus albidus* huwa wiehed mill-akbar (sa 15-il mm) tal-ispeċi Enchytraeidae tal-familja annelid oligochaete, u jinsab mifruż 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 razzi differenti ta' din l-ispeċi.

Enchytraeus albidus jista' jinkiseb kummerċjalment, u jinbiegħ bħala ikel għall-hut. Wiehed għandu jara jekk il-kultura tiegħu tkunx ikkontaminata minn speċijiet oħra, is-soltu iżgħar (60). Jekk ikun hemm kontaminazzjoni, id-dud kollu għandu jinhasel fl-ilma f'dixx Petri. Eżemplari kbar adulti ta' *Enchytraeus albidus* imbagħad jintgħazlu (bl-użu ta' stereomikroskopju) biex tinbeda kultura ġdida. Id-dud l-iehor kollu jitwarrab. Iċ-ċiklu ta' hajtu huwa qasir minhabba 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 wahda) mingħajr problemi għandhom jintużaw għat-test.

Speċijiet oħra tal-ġeneru *Enchytraeus* huma adatti wkoll, l-aktar *Enchytraeus luxuriosus*. Din l-ispeċi tassew tghix 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, minhabba li kienet deskritta biss minn kulturi ta' ħniex u munzelli ta' kompost (Römbke 2003). Il-htigijiet originali ekoloġiċi tagħha mhumiex, għalhekk, magħ-rufin. Izda, studji recenti 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 studji ekotossikoloġiċi minhabba s-semplikità tat-trobbija u l-ittestjar tagħha (eż. Kuperman et al. 2003). Izda 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' izda ma jehtiglux ikun iżgħar. Barra minn dan, għandu jitqies li din l-ispeċi tirriproduċi b'mod mgħaġġel hafna 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'kaxx 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 minhabba 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 izda 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 tinzamm f'inkubatur f'temperatura ta' 15 ± 2 °C mingħajr dawl. F'kull każ għandha tkun evitata temperatura oghla minn 23 °C. L-irtuba tal-ħamrija artifiċjali/naturali għandha tkun niedja izda mhux imxarba. Meta l-ħamrija tingħafas bil-mod bl-idejn, għandhom joħroġu biss fiit 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 titrewwah billi titħawwad b'attenzjoni darba fil-ġimgħa.

▼ **M4**

Id-dud għandu jintema' mill-anqas darba fil-gimgha sakemm jixba' bi fjokki tal-hafur li jitqieghdu f'hofra fil-wieċ tal-hamrija u jitghattew bil-hamrija. Jekk fil-kontenitur ikun baqa' ikel mill-ahhar data ta' tmigh, l-ammont ta' ikel mogħti għandu jkun agġustat b'dan il-mod. Jekk fuq l-ikel li jifdal jikber il-faqqiegh, huwa għandu jimbidel bi kwantità għdida ta' fjokki ta' hafur. Biex ir-riproduzzjoni tkun stimulata, il-fjokki tal-hafur jistgħu jkunu ssupplimentati bi trab ta' proteini, disponibbli kummerċjalment, imtejjeb b'vitamini kull gimagħtejn. Wara tliet xhur, l-annimali jkunu ttrasferiti għal kultura jew għal substrat ta' trobbija mhejjin friski. Il-fjokki tal-hafur, li jkollhom jinħażnu f'reċipienti ssiġillati, għandhom jissahhnu f'awtoklav jew jissahhnu qabel jintużaw biex ikunu evitati infezzjonijiet minn araknidi tad-dqiq (eż. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) jew minn araknidi tal-htif (eż. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Wara li jkun iddizinfettat, l-ikel jintahan biex ikun jista' jitferrex faċilment fuq il-wieċ tal-hamrija. Sors ieħor possibbli ta' ikel huwa l-hmira tal-furnar jew l-ikel tal-hut TetraMin®.

Inġenerali, il-kondizzjonijiet tal-mod ta' kultura jkunu suffiċjenti jekk id-dud ma jippruvax jitlaq mis-substrat, ma jiċċaqlaqx malajr fil-hamrija, ma jurix wiċċ estern ileqq mingħajr partiċelli ta' hamrija mwahħlin miegħu, ikun f'it 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 magħzula 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.

▼ M6

C.31. TEST TAL-PJANTA TERRESTRI: TFAĊĊJAR TAN-NEBBIET U TEST TAT-TKABBIR TAN-NEBBIET

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida tal-Ittestjar (TG) 208 tal-OECD (2006). Il-metodi tal-ittestjar jiġu perijodikament irrive-duti fid-dawl tal-progress xjentifiku u l-applikabbiltà għall-użu regolatorju. Dan il-metodu ta' ttestjar aġġornat huwa mahsub biex jivvaluta l-effetti potenzjali tas-sustanzi kimiċi fuq it-tfaċċar u t-tkabbir tan-nebbiet. Bħala tali ma jkoprix l-effetti kroniċi jew l-effetti fuq ir-riproduzzjoni (jiġifieri sett ta' żrieragh, il-formazzjoni tal-fjura, maturazzjoni tal-frott). Il-kundizzjonijiet tal-espożizzjoni u proprjetajiet tas-sustanza kimika li għandha tiġi ttestjata għandhom jiġu kkunsidrati biex jiżguraw li jintużaw metodi ta' ttestjar xierqa (eż. meta jiġu ttestjati metalli/komposti tal-metall, għandhom jiġu kkunsidrati l-effetti tal-pH u l-kontrolljoni assoċjati) (1). Dan il-metodu ta' ttestjar ma għandux jindirizza l-pjanti esposti għal fwar tas-sustanzi kimiċi. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi ġenerali, il-bijocidi u l-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti (magħrufa wkoll bħala l-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti jew il-pestiċidi). Dan ġie żviluppat abbażi tal-metodi eżistenti (2) (3) (4) (5) (6) (7). Kienu kkunsidrati wkoll referenzi oħra pertinenti għall-ittestjar tal-pjanti (8) (9) (10). Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet użati.

PRINĊIPJU TAL-ITTESTJAR

2. It-test jivvaluta l-effetti fuq it-tfaċċar tan-nebbiet u t-tkabbir bikri ta' pjanti oġġa wara espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija (jew matrici tal-hamrija xierqa oħra). Iz-żrieragh jitqieghdu f'kontatt ma' hamrija trattata bis-sustanza kimika tat-test u evalwata għall-effetti li ġejjin normalment 14-21 jum wara 50 % ħolqien tan-nebbieta fil-grupp ta' kontroll. Il-punti ta' tmiem imkejla huma valutazzjoni viżwali tal-ħolqien tan-nebbieta, piż tan-nebbieta niexfa (inhejja piż tan-nebbieta frisk) u f'ċerti każijiet l-għoli tan-nebbieta, kif ukoll valutazzjoni tal-effetti detrimentali viżibbli f'partijiet differenti tal-pjanta. Dawn il-kejljiet u osservazzjonijiet jitqabblu ma' daww ta' pjanti ta' kontroll mhux ittrattati.
3. Skont ir-rotta mistennija tal-espożizzjoni, is-sustanza kimika tat-test hija inkorporata fil-hamrija (jew possibbilment f'matrici tal-hamrija artifiċjali) jew applikata mal-wiċċ tal-hamrija, li tirrappreżenta b'mod xieraq ir-rotta potenzjali tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika. L-inkorporazzjoni tal-hamrija ssir billi tiġi trattata l-hamrija aggregata. Wara l-applikazzjoni, il-hamrija tiġi ttrasferita fil-qsari, u mbagħad żrieragh tal-ispeċi tal-pjanti partikolari jinżerghu fil-hamrija. L-applikazzjonijiet fuq il-wiċċ isiru f'hamrija fil-qsari fejn diġa nżerghu ż-żrieragh. L-unitajiet tal-ittestjar (kontrolli u hamriji ittrattati flimkien maz-żrieragh) imbagħad jitqieghdu f'kundizzjonijiet xierqa biex tiġi appoġġjata l-ġerminazzjoni/tkabbir tal-pjanti.
4. It-test jista' jitwettagħ sabiex tiġi ddeterminata l-kurva ta' doża-rispons, jew konċentrazzjoni/rata unika bħala test tal-limitu skont l-għan tal-istudju. Jekk ir-riżultati mit-test tal-konċentrazzjoni/rata jaqbuż ċertu livell ta' tossiċità (eż. jekk jiġu osservati effetti ikbar minn x %), jitwettagħ test tas-sejba tal-medda biex jiġu ddeterminati l-limiti superjuri u inferjuri għat-tossiċità segwiti minn test tal-konċentrazzjoni/rata biex tiġi ġġenerata kurva ta' doża-rispons. Analizi statistika xierqa tintuża biex tinkiseb konċentrazzjoni EC_x effikaċi jew rata ta' applikazzjoni effikaċi ER_x (eż. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) għall-parametru/parametri l-iktar sensittivi ta' interess. Barra minn hekk, f'dan it-test tista' tiġi kkalkolata l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u l-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

5. L-informazzjoni li ġejja hija utli għall-identifikazzjoni tar-rotta mistennija tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika u fit-tfassil tat-test: il-formula strutturali, il-purità, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fis-solventi organiċi,

▼ **M6**

il-koeffiċjent tal-partizzjoni l-ottanol/ilma, l-imġiba tas-sorbiment tal-hamrija, il-pressjoni tal-fwar, l-istabbiltà kimika fl-ilma u d-dawl, u l-bijo-degradabbiltà.

VALIDITÀ TAT-TEST

6. Sabiex it-test jiġi kkunsidrat validu, il-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati fil-kontrolli:

- it-tfaċċar ta' nebbietahuwa tal-inqas 70 %;
- in-nebbieta ma jurux effetti fitotossiċi viżibbli (eż. klorożi, nekrozi, dbiel, deformazzjoni tal-weraq u zkuk) u l-pjanti jesibixxu biss varjazzjoni normali fit-tkabbir u l-morfologija għal dik l-ispeċi partikolari;
- is-sopravivenza medja tan-nebbieta ta' kontroll li nholqu hija tal-inqas 90 % għad-durata tal-istudju;
- kundizzjonijiet ambjentali għal speċi partikolari huma identiċi u l-midjums tat-tkabbir fihom l-istess ammont tal-matriċi tal-hamrija, il-midjums ta' appoġġ, jew sottostrat għall-istess sors.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. Sustanza kimika ta' referenza jaf tiġi ttestjata f'intervalli regolari, biex tiġi vverifikata l-prestazzjoni tat-test u r-rispons tal-pjanti tat-test partikolari u l-kundizzjonijiet tat-test ma nbidlux b'mod sinifikanti maż-żmien. Inkella, il-bijomassa storika jew il-kejl tat-tkabbir tal-kontrolli jistgħu jintużaw biex jevalwaw il-prestazzjoni tas-sistema fl-laboratorji partikolari, u jistgħu jservu bħala mizura ta' kontroll tal-kwalità għal-laboratorju.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Hamrija naturali — Sottostrat artifiċjali**

8. Il-pjanti jistgħu jitkabbru fi qsari permezz ta' hamrija ramlija, ramel lomuż, jew hamrija taflija bir-ramel li fiha sa 1,5 fil-mija karbonju organiku (madwar 3 fil-mija materja organika). Jistgħu jintużaw ukoll hamrija għat-twahhil kummerċjali jew tahlita ta' hamrija sintetika li fihom sa 1,5 fil-mija karbonju organiku. Il-hamrija taflija ma għandhiex tintuża jekk is-sustanza kimika tat-test tkun magħrufa li għandha affinità għolja għat-tafal. Il-hamrija tas-sit għandha tintgħarbel għal 2 mm daqs tal-fراك sabiex tiġi omogenizzata u jitneħħa l-fراك ohxon. Għandu jiġi rrapportat it-tip u l-konsistenza, % karbonju organiku, il-pH u l-kontenut tal-melħ bħala konduttività elettronika tal-hamrija mhejjija finali. Il-hamrija għandha tiġi kklassifikata skont skema ta' klassifikazzjoni standard (11). Il-hamrija tista' tiġi pasturizzata jew ittrattata bis-shana sabiex jitnaqqas l-effett tal-patogeni tal-hamrija.
9. Il-hamrija naturali tista' tikkomplika l-interpretazzjoni tar-riżultati u żżid l-varjabbiltà minhabba proprjetajiet fiżiċi/kimiċi u popolazzjonijiet mikrobjali differenti. Dawn il-varjabbli sussegwentement ibiddu l-kapaċità ta' żamma ta' umdità, il-kapaċità ta' rbit tas-sustanzi kimiċi, l-arjazzjoni, u l-kontenut tal-elementi tan-nutrijenti u t-traċċi. Minbarra l-varjazzjonijiet għal dawn il-fatturi fiżiċi, sejjer ikun hemm ukoll varjazzjoni fil-proprjetajiet kimiċi bħall-pH u l-potenzjal ta' redox, li tista' taffettwa l-bijodisponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test (12) (13) (14).
10. Is-sottostrati artifiċjali ġeneralment ma jintużawx għall-ittestjar ta' prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, iżda jistgħu jkunu ta' użu għall-ittestjar ta' sustanzi kimiċi ġenerali jew fejn ikun mixtieq li titnaqqas il-varjabbiltà tal-hamrija naturali u tizdied il-paragunabbiltà tar-riżultati tat-test. Is-sottostrati użati għandhom ikunu komposti ta' materjali inertli li jnaqqsu l-interazzjoni mas-sustanza kimika tat-test, il-portatur tas-solvent, jew it-tnejn li huma. Ramel kwaruż mahsul bl-aċidu, suf minerali u żibeg tal-ħġieġ (eż. b'dijametru bejn 0,35 u 0,85 mm) instabu li huma materjali inertli xierqa li

▼ **M6**

jassorbu minimalment is-sustanza kimika tat-test (15), u dan jiżgura li s-sustanza kimika tkun disponibbli kemm jista' jkun kollha għaż-żerriegħa permezz tat-teħid mill-għeruq. Is-sottostrati mhux xierqa, ikunu jinkludu vermikolat, perlat jew materjali oħra assorbenti hafna. Għandhom jiġu pprovduti nutrijenti għat-*tkabbir* tal-pjanti biex jiġi żgurat li l-pjanti ma jkunux taħt stress minħabba nuqqasijiet ta' nutrijenti, u fejn ikun possibbli dan għandu jiġi vvalutat permezz ta' analiżi tas-sustanzi kimiċi jew b'valu-tazzjoni viżwali tal-pjanti ta' kontroll.

Kriterji għall-għażla tal-ispeċijiet tat-test

11. L-ispeċijiet magħżula għandhom ikunu raġonevolment varjati, eż. meta wiehed iqis id-diversità tassonomika tagħhom fir-renju tal-pjanti tagħhom, id-distribuzzjoni tagħhom, l-abbundanza, il-karatteristiċi taċ-ċiklu tal-hajja speċifiku għall-ispeċi u r-reġjun ta' okkorrenza naturali, biex tiġi żviluppata medda ta' risponsi (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Il-karatteristiċi li ġejjin tal-ispeċijiet tat-test possibbli għandhom jiġu kkunsidrati fl-għażla:

— l-ispeċijiet għandhom żerriegħa uniformi li huma disponibbli minnufih minn sors(i) standard affidabbli ta' żerriegħa u li jipproduċu germinazzjoni konsistenti, affidabbli u uguali, kif ukoll *tkabbir* tan-nebbieta uniformi;

— il-pjanta hija soġġetta għall-ittestjar fil-laboratorju, u tista' tagħti riżultati affidabbli u riproduċibbli fi hdan u fil-faċilitajiet ta' ttestjar kollha;

— is-sensittività tal-ispeċijiet ittestjati għandha tkun konsistenti mar-risponsi tal-pjanti misjuba fl-ambjent espost għas-sustanza kimika;

— dawn intużaw sa ċertu punt f'testijiet tat-tossicità preċedenti u l-użu tagħhom, pereżempju, f'*bijoassaġġi* tal-haxix, skrinjar ta' metalli tqal, testijiet tas-salinità jew it-testijiet tal-istress minerali jew studji tal-allopatija jindika sensitività għal varjetà wiesgħa ta' fatturi li jgħolqu pressjoni;

— huma kompatibbli mal-kundizzjonijiet ta' *tkabbir* tal-metodu ta' ttestjar;

— jissodisfaw il-kriterji ta' validità tat-test.

Xi whud mill-ispeċijiet tat-test l-iktar storikament użati huma elenkati fl-Appendiċi 2 u l-ispeċijiet li potenzjalment mhumex pjanti fl-Appendiċi 3.

12. In-numru ta' speċijiet li għandhom jiġu ttestjati jiddependi fuq ir-rekwiżiti regolatorji rilevanti, għalhekk mhuwiex speċifikat f'dan il-metodu ta' ttestjar.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

13. Is-sustanza kimika għandha tiġi applikata f'portatur xieraq (eż. ilma, aċetun, etanol, polietilen glikol, gomma Għarbija, ramel). Tahlitiet (prodotti formulati jew formulazzjonijiet) li jkun fihom ingredjenti attivi u diversi aġġuvanti jistgħu jiġu ttestjati wkoll.

Inkorporazzjoni f'hamrija/sottostrat artifiċjali

14. Is-sustanzi kimiċi li jinħallu fl-ilma jew huma suspiżi fl-ilma jistgħu jiżdiedu mal-ilma, u mbagħad is-soluzzjoni tithallat mal-hamrija b'apparat ta' tahlit xieraq. Dan it-tip ta' test jista' jintuża jekk l-espożizzjoni għas-sustanza kimika tkun permezz tal-hamrija jew ilma interstizjali tal-hamrija u li hemm thassib li tingħbed mill-għeruq. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma tal-hamrija ma għandhiex tinqabeż biż-żieda tas-sustanza kimika tat-test. Il-volum ta' ilma miżjud għandu jkun l-istess għal kull koncentrazzjoni tat-test, iżda għandu jkun limitat biex jiġi evitat it-tagħqid agglomerat tal-hamrija.

▼ M6

15. Is-sustanzi kimiċi b'solubbiltà fl-ilma baxxa għandhom jinhallu f'solvent volatili xieraq (eż. aċetun, etanol) u mhallta bir-ramel. Imbagħad is-solvent jista' jitneħħa mir-ramel permezz ta' fluss ta' arja filwaqt li jitkompla jithallat ir-ramel. Ir-ramel ittrattat jithallat mal-hamrija sperimentali. Jiġi stabbilit kontroll iehor li jirċievi ramel u solvent biss. Jiżdiedu ammonti ugwali ta' ramel, b'solvent imhallat u mneħħi mal-livelli ta' trattament kollha u t-tieni kontroll. Għal sustanzi kimiċi tat-test solidi u li ma jinhallux, il-hamrija xotta u s-sustanza kimika jithalltu f'apparat ta' tahlit xieraq. Minn hawn 'il quddiem, il-hamrija titpoġġa fil-qsari u ż-żerriegħa tinżera' minnufih.
16. Meta jintuża sottostrat artifiċjali minflok il-hamrija, is-sustanzi kimiċi li jinhallu fl-ilma jistgħu jinhallu fis-soluzzjoni tan-nutrijenti eżattament qabel il-bidu tat-test. Is-sustanzi kimiċi li ma jinhallux fl-ilma, li iżda jistgħu jiġu sospizi fl-ilma permezz ta' portatur ta' solvent, għandhom jiżdiedu mal-portatur, mas-soluzzjoni tan-nutrijenti. Is-sustanzi kimiċi li ma jinhallux fl-ilma, li għalihom m'hemm disponibbli ebda portatur mhux tossiku li jinhall fl-ilma, għandhom jinhallu f'solvent volatili xieraq. Is-soluzzjoni kimika tithallat mar-ramel jew maz-żibeg tal-ħġieg, titpoġġa f'apparat vakwu rotatorju, u tiġi evaporata, biex tibqa' kisja uniformi ta' sustanza kimika fuq ir-ramel jew iż-żibeg. Porzjon ippeżat ta' żibeg għandu jiġi estratt bl-istess solvent organiku u s-sustanza kimika tiġi assaġġjata qabel jimtlew il-kontenituri tal-qsari.

Applikazzjoni fuq il-wiċċ

17. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, hafna drabi wiċċ il-hamrija tiġi sprejjata bis-soluzzjoni tat-test għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. It-tagħmir kollu użat fit-tweġġ tat-testijiet, inkluż it-tagħmir użat biex tiġi ppreparata u tingħata s-sustanza kimika tat-test, għandu jkun ta' tali disinn u kapaċità li t-testijiet li jinvolvu dan it-tagħmir jistgħu jitwettqu b'mod preċiż u li jagħti kopertura riproducibbli. Il-kopertura għandha tkun uniformi fl-uċuħ tal-hamrija kollha. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-possibbiltà li s-sustanzi kimiċi jiġu adsorbiti mit-tagħmir jew ikun hemm reazzjoni miegħu (eż. tubi tal-plastik u sustanzi kimiċi lipofiliċi jew parts u elementi tal-azzar). Is-sustanza kimika tat-test tiġi sprejjata fuq wiċċ il-hamrija b'simulazzjoni ta' applikazzjonijiet tat-tank tal-isprej tipiċi. Generalment, il-volumi tal-isprej għandhom ikunu fil-medda ta' Prattika Agrikola normali u l-volumi (għandu jiġi rrapportat l-ammont ta' ilma, eċċ). It-tip ta' zennuna għandha tintgħazel biex tipprovi kopertura uniformi ta' wiċċ il-hamrija. Jekk jiġu applikati solventi u portaturi, għandu jiġi stabbilit grupp iehor ta' pjanti ta' kontroll li jirċievi biss is-solvent/portatur. Dan mhuwiex meħtieġ għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti ttestjati bħala formulazzjonijiet.

Verifika tal-konċentrazzjoni/rata tas-sustanza kimika tat-test

18. Il-konċentrazzjonijiet/rati ta' applikazzjoni għandhom jiġu kkonfermati minn verifika analitika xierqa. Għal sustanzi kimiċi li jinhallu, verifika tal-konċentrazzjonijiet/rati tat-test kollha tista' tiġi kkonfermata b'analizi tal-ogħla konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tat-test għat-test b'dokumentazzjoni dwar id-dilwizzjoni sussegwenti u l-użu ta' tagħmir ta' applikazzjoni kkalibrat (eż. oġġetti tal-ħġieg analitiċi kkalibrati, kalibrazzjoni tat-tagħmir ta' applikazzjoni tal-isprej). Għal sustanzi kimiċi li ma jinhallux, għandha tiġi pprovduta verifika tal-materjal kompost bil-piżijiet tas-sustanza kimika tat-test miżjuda mal-hamrija. Jekk ikun hemm bżonn ta' dimostrazzjoni ta' omoġenità, jaf tkun meħtieġa analizi tal-hamrija.

PROCEDURA

Disinn tat-test

19. Iż-żrieragħ tal-istess speċi jithawlu fil-qsari. In-numru ta' żrieragħ miżrugħa f'kull qasrija sejjer jiddependi skont l-ispeċi, id-daqs tal-qasrija u d-durata tat-test. In-numru ta' pjanti f'kull qasrija għandu jipprovi kundizzjonijiet ta' tkabbir adegwati u jevita ffullar matul it-test. Id-densità massima ta' pjanti

▼ M6

għandha tkun 3 — 10 żrieragh f'kull 100 cm² skont id-daqs taż-żrieragh. Eż., hija rakkomandata pjanta tal-qamh, tas-sojja, tat-tadam, tal-hjar, jew tal-pitravi taz-zokkor f'kull kontenitur ta' 15 cm; tliet pjanti tal-kolza jew tal-piżelli f'kull kontenitur ta' 15 cm; u 5 sa 10 basliet, qamh, jew żrieragh żgħar oħra f'kull kontenitur ta' 15 cm. In-numru ta' żrieragh u qsari repliki (ir-replikati huwa ddefinit bħala qasrija, għallhekk il-pjanti fl-istess qasrija ma jikkostitwixxux replikat) għandu jkun adegwat għall-aħjar analiżi statistika (21). Wiehed għandu jinnota li l-varjabbiltà sejra tkun ikbar għall-ispeċijiet tat-test permezz ta' inqas żrieragh kbar f'kull qasrija (repliki), meta mqabbel mal-ispeċijiet tat-test fejn huwa possibbli li jintużaw numri ikbar ta' żrieragh f'kull qasrija. Bit-thawwil ta' numru ugwali ta' żrieragh f'kull qasrija, din il-varjabbiltà tista' titnaqqas.

20. Jintużaw gruppi ta' kontroll biex jiġi assigurat li l-effetti osservati huma assoċjati mal-espożizzjoni tas-sustanza kimika tat-test jew attribwita lilha. Il-grupp ta' kontroll xieraq għandu jkun identiku f'kull aspekt għall-grupp tat-test hlief għall-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test. F'test partikolari, il-pjanti tal-itestjar kollha inkluż il-kontrolli għandhom ikunu mill-istess sors. Biex tkun evitata imparzjalità, hija mehtieġa assenjażzjoni każwali tal-qsari tat-test u ta' kontroll.
21. Għandhom jiġu evitati żrieragh miksija b'insettiċidju jew fungicidju (jiġifieri żrieragh "imlibbsa"). Madankollu, l-użu ta' ċerti fungicidji ta' kuntatt mhux sistemiku (eż. captan, thiram) huwa permess minn xi awtoritajiet regolatorji (22). Jekk il-patoġeni li jingarru miż-żerriegħa huma ta' thassib, iż-żrieragh jistgħu jixxaru għal ftit hin f'soluzzjoni ta' 5 % ipoklorit dgħajfa, imbagħad jitlaħhalu b'mod estensiv taht l-ilma tal-vit u jitnixxfu. Mhuwa permess ebda trattament rimedjali bi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti oħrajn.

Kundizzjonijiet tat-test

22. Il-kundizzjonijiet tat-test għandhom ikunu kemm jista' jkun l-istess bħal dawk il-kundizzjonijiet mehtieġa għat-tkabbir normali għall-ispeċijiet u l-varjetajiet ittestjati (Appendiċi 4 jipprovdi eżempji tal-kundizzjonijiet tat-test). Il-pjanti godda għandhom jinżammu bi prattiki ortikulturali godda f'kmamar b'ambjent ikkontrollat, fitotroni, jew serer. Meta jintużaw faċilitajiet tat-tkabbir, dawn il-prattiki ġeneralment jinkludu reġistrazzjoni ta' kontroll u adegwament frekwenti (eż. kuljum) tat-temperatura, l-umdità, il-koncentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju, id-dawl (l-intensità, it-tul tal-mewġa, ir-radjażzjoni attiva fotosintetikament) u l-perjodu ta' dawl, mezz ta' tisqija, eċċ, biex jiġi assigurat tkabbir tajjeb tal-pjanti kif iġġudikat mill-pjanti ta' kontroll tal-ispeċijiet magħżulin. It-temperaturi tas-serer għandhom jiġu kkontrollati permezz ta' sistemi ta' ventilazzjoni, tishin u/jew tkessiħ. Ġeneralment, il-kundizzjonijiet li ġejjin huma rakkomandati għall-itestjar tas-serer:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C;

— umdità: 70 % ± 25 %;

— fotoperjodu: minimu ta' 16-il siegħa ta' dawl;

— intensità tad-dawl: 350 ± 50 µE/m²/s. Jaf ikun mehtieġ dawl addizzjonali jekk l-intensità tonqos taht 200 µE/m²/s, tul tal-mewġa 400 — 700 nm hlief għal ċerti speċijiet li għandhom inqas rekwiziti ta' dawl.

Il-kundizzjonijiet ambjentali għandhom jiġu ssorveljati u rrapportati matul l-istudju. Il-pjanti għandhom jitkabbru f'plastik mhux poruż jew qsari bi ġieġ doppju bi trej jew plattina taht il-qasrija. Il-qsari jistgħu jitqieghdu f'post

▼ M6

ieħor kull ċertu żmien biex titnaqqas il-varjabbiltà fit-tkabbir tal-pjanti (minhabba d-differenzi fil-kundizzjonijiet tat-test fi hdan il-faċilitajiet ta' tkabbir). Il-qさり għandhom ikunu kbar biżżejjed biex jippermettu tkabbir normali.

23. In-nutrijenti tal-ħamrija jistgħu jiġu ssupplimentati kif meħtieġ biex jinżamm vigur tajjeb tal-pjanti. Il-ħtieġa u l-ġhażla tal-hin ta' nutrijenti addizzjonali tista' tiġi ġġudikata bl-osservazzjoni tal-pjanti ta' kontroll. Hija rakkomandata t-tisqija mill-qiegħ tal-kontenituri tat-test (eż. permezz ta' ftejjel tal-fibra tal-ħġieġ). Madankollu, tista' tintuża tisqija inizjali minn fuq biex tiġi stimolata l-ġerminazzjoni taż-żrieragħ, u għall-applikazzjoni fuq wiċċ il-ħamrija, tiffaċilita l-moviment tas-sustanza kimika fil-ħamrija.
24. Il-kundizzjonijiet ta' tkabbir speċifiċi għandhom ikunu xierqa għall-ispeċijiet ittestjati u s-sustanza kimika tat-test investigata. Il-pjanti ta' kontroll u ttrattati għandhom jinżammu fl-istess kundizzjonijiet, madankollu għandhom jittieħdu miżuri adegwati biex tiġi evitata espożizzjoni inkroċjata (eż. ta' sustanzi kimiċi volatili) bejn trattamenti differenti u tal-kontrolli għas-sustanza kimika tat-test.

Ittestjar f'konċentrazzjoni/rata unika

25. Sabiex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni/rata xierqa ta' sustanza kimika għat-tweqqi ta' test (ta' sfida/limitu) tar-rata jew ta' konċentrazzjoni unika, għandhom jiġu kkunsidrati bosta fatturi. Għal sustanzi kimiċi ġenerali, dawn jinkludu l-proprietajiet fiżiċi/kimiċi tas-sustanza kimika. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, il-proprietajiet fiżiċi/kimiċi u l-mudell ta' użu tas-sustanza kimika tat-test, jeħtieġ li tiġi kkunsidrata l-konċentrazzjoni massima jew ir-rata ta' applikazzjoni, in-numru ta' applikazzjonijiet f'kull staġun u/jew il-persistenza tas-sustanza kimika tat-test. Biex jiġi ddeterminat jekk sustanza kimika ġenerali għandhiex proprjetajiet fitotossici, jaf ikun xieraq li jiġi ttestjat il-livell massimu ta' ħamrija xotta ta' 1 000 mg/kg.

Test tas-sejba tal-medda

26. Meta jkun meħtieġ jista' jitwettaq test tas-sejba tal-medda biex jipprovdi gwida dwar il-konċentrazzjonijiet/rati li għandhom jiġu ttestjati fi studju finali dwar ir-rispons għad-doża. Għat-test tas-sejba tad-doża, il-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar għandhom jiġu spazjati sew (eż. ħamrija xotta ta' 0,1, 1,0, 10, 100 u 1 000 mg/kg). Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, il-konċentrazzjonijiet/rati jistgħu jkun bbażati fuq il-konċentrazzjoni jew ir-rata ta' applikazzjoni rakkomandata jew massima, eż. 1/100, 1/10, 1/1 tal-konċentrazzjoni jew rata ta' applikazzjoni rakkomandata/massima.

Ittestjar f'konċentrazzjonijiet/rati multipli

27. Il-fini tat-test b'konċentrazzjonijiet/rati multipli huwa li jistabbilixxi relazzjoni bejn id-doża u r-rispons u li jiġi ddeterminat il-valur EC_x jew ER_x għat-tfaċċar, il-bijomassa u/jew l-effetti viżwali meta mqabbel ma' kontrolli mhux esposti, kif meħtieġ mill-awtoritajiet regolatorji.
28. In-numru u l-ispażju tal-konċentrazzjonijiet jew ir-rati għandhom ikunu biżżejjed biex jiġġeneraw relazzjoni bejn id-doża u r-rispons u l-ekwazzjoni tar-rigressjoni u jagħti stima tal- EC_x jew ER_x . Il-konċentrazzjonijiet/rati magħżula għandhom jinkludu l-valuri EC_x jew ER_x li għandhom jiġu ddeterminati. Pereżempju, jekk ikun meħtieġ valur EC_{50} huwa rakkomandabbli li jsir ittestjar f'rati li jipproduċu effett bejn 20 sa 80 %. In-numru rakkomandat tal-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar biex jintlaħaq dan huwa tal-inqas ħamsa f'serje ġeometrika flimkien ma' kontroll mhux ittrattat, u

▼ M6

spazjat b'fattur li ma jaqbix tlieta. Ghal kull grupp ta' trattament u kontroll, in-numru ta' repliki ghandu jkun tal-inqas erbgħa u n-numru totali ta' żrieragħ għandu jkun tal-inqas 20. Iktar repliki ta' ċerti pjanti b'rata ta' ġermi-nazzjoni baxxa jew b'drawwiet ta' tkabbir varjabbli jaf ikunu meħtieġa biex tizzied is-setgħa statistika tat-test. Jekk jintużaw numru kbir ta' konċentrazzjonijiet/rati tat-test, jista' jtnaqqas in-numru ta' repliki. Jekk trid tiġi stmata l-NOEC, jaf ikunu meħtieġa iktar repliki biex tinkiseb s-setgħa statistika mixtieqa (23).

Osservazzjonijiet

29. Matul il-perjodu ta' osservazzjoni, jiġifieri bejn 14 u 21 jum wara li tfaċċaw 50 % tal-pjanti ta' kontroll (il-kontrolli ta' solventi ukoll, jekk ikun applikabbli), il-pjanti huma osservati frekwentement (tal-inqas kull ġimgħa u jekk ikun possibbli kuljum) għat-tfaċċar u l-fitotossicità u l-mortalità viżwali. Fi tmiem it-test, għandu jiġi rreġistrat il-kejl tat-tfaċċar perċentwali u l-bijomassa tal-pjanti li jibqgħu hajjin, kif ukoll l-effetti detrimentali viżibbli fil-partijiet differenti tal-pjanta. Din tal-aħħar tinkludi anomalitajiet fid-dehra taż-żrieragħ li tfaċċaw, twaqqif tat-tkabbir, klorozi, skolorazzjoni, mortalità, u effetti fuq l-iżvilupp tal-pjanta. Il-bijomassa finali tista' titkejjel permezz tal-piż xott medju tan-nebbieta tal-pjanti li jibqgħu hajjin, billi n-nebbieta tinżera f'wiċċ il-hamrija u titnixxef għal piż kostanti ta' 60 °C. Inkella, il-bijomassa finali tista' titkejjel permezz tal-piż frisk tan-nebbieta. L-gholi tan-nebbieta jaf ikun punt ta' tmiem iehor, jekk ikun meħtieġ mill-awtoritajiet regolatorji. Għandha tintuża sistema ta' punteġġi uniformi għal dannu viżwali biex jiġu evalwati r-risponsi tossiċi osservabbli. Fir-referenzi (23) (24), ingħataw eżempji għat-twettiq ta' klassifikazzjonijiet viżwali kwalitattivi jew kwantitattivi.

DEJTA U RAPPORTAR

Analizi statistika*Test f'konċentrazzjoni/rata wahda*

30. Dejta għal tali speċijiet ta' pjanti għandha tiġi analizzata permezz ta' metodu statistiku xieraq (21). Għandu jiġi rrapportat il-livell ta' effett fil-konċentrazzjoni/rata tat-test, jew in-nuqqas ta' l-huq ta' effett partikolari fil-konċentrazzjoni/rata tat-test (eż., $< x$ % l-effett osservat f'konċentrazzjoni jew rata y)

Test f'konċentrazzjoni/rata multipla

31. Hija stabbilita relazzjoni bejn id-doża u r-rispons f'termini ta' ekwazzjoni ta' rigressjoni. Jistgħu jintużaw mudelli differenti: pereżempju, biex jiġu stmati l- EC_x jew ER_x (eż. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) u l-limiti ta' kunfidenza għat-tfaċċar bħal-dejta kwantali, il-metodi logit, probit, Weibull, Spearman-Kärber, Spearman-Kärber trimmjat, eċċ jistgħu jkunu xierqa. Għat-tkabbir tan-nebbieta (piż u għoli) bħala punti ta' tmiem kontinwi EC_x jew ER_x u l-limiti ta' kunfidenza tiegħu, jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (eż. analiżi tar-rigressjoni mhux lineari Bruce-Versteeg (25)). Kull meta jkun possibbli, $1-R^2$ għandu jkun 0,7 jew oghla għall-biċċa l-kbira tal-ispeċijiet sensitivi u l-konċentrazzjonijiet/rati tal-ittestjar użati biex jinkludu effetti bejn 20 % u 80 %. Jekk għandha tiġi stmata l-NOEC, l-applikazzjoni ta' testijiet statistiċi b'saħħithom għandu jkun ippreferut u dawn għandhom jintgħażlu abbażi tad-distribuzzjoni tad-dejta (21) (26).

Rapport tat-test

32. Ir-rapport tat-test għandu jippreżenta riżultati tal-istudji kif ukoll deskrizzjoni ddettaljata tal-kundizzjonijiet tat-test, diskussjoni fid-dettall tar-riżultati, analiżi tad-dejta, u l-konkluzjonijiet miġbura mill-analiżi. Għandu jiġi pprovdut sommarju tabulari u silta mir-riżultati. Ir-rapport għandu jinkludi dawn li ġejjin:

▼ **M6***Sustanza kimika tat-test:*

- dejta ta' identifikazzjoni tas-sustanza kimika, proprjetajiet rilevanti tas-sustanza kimika ttestjata (eż. log P_{ow} , solubbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba ambjentali, jekk tkun disponibbli);
- dettalji dwar it-tnejja tas-soluzzjoni tat-test u l-verifika tal-koncentrazzjonijiet tat-test kif speċifikat fil-paragrafu 18.

Speċijiet tat-test:

- dettalji dwar l-organizmu tat-test: speċi/varjetà, familji tal-pjanti, ismijiet xjentifiċi u komuni, sors u storja taż-żerriegħa kemm jista' jkun iddettaljata (jiġifieri isem il-fornitur, ġerminazzjoni perċentwali, klassi tad-daqs, lott jew numru tal-lott taż-żerriegħa, lott jew numru tal-lott, sena taż-żerriegħa jew staġun tat-tkabbir meta ngabret, klassifikazzjoni tad-data ta' ġerminazzjoni) vijabbiltà, eċċ;
- numru ta' monospeċijiet u speċijiet di-kotiledon ittestjati;
- raġunament għall-għażla tal-ispeċijiet;
- deskrizzjoni tal-ħżin, it-trattament u ż-żamma taż-żerriegħa.

Kundizzjonijiet tat-test:

- faċilità tal-ittestjar (eż. kompartment tat-tkabbir, fitotron u serra);
- deskrizzjoni tas-sistema tat-test (eż. il-qisien tal-qsari, il-materjal tal-qsari l-ammonti ta' ħamrija);
- karatteristiċi tal-ħamrija (konsistenza jew tip ta' ħamrija: distribuzzjoni u klassifikazzjoni tal-frak tal-ħamrija, proprjetajiet fiżiċi u kimiċi inkluż l-% ta' materja organika, l-% tal-karbonju organiku u l-pH);
- preparazzjoni ta' ħamrija/sottostrat (eż. ħamrija, ħamrija artifiċjali, ramel u oħrajn) qabel it-test;
- deskrizzjoni tal-midjum tan-nutrijenti jekk jintuża;
- applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: deskrizzjoni tal-metodu ta' applikazzjoni, deskrizzjoni tat-tagħmir, rati ta' espożizzjoni u volumi li jinkludu l-verifika tas-sustanza kimika, deskrizzjoni tal-metodu ta' kalibrizzjoni u deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet ambjentali matul l-applikazzjoni;
- kundizzjonijiet tat-tkabbir: intensità tad-dawl (eż. PAR, radjazzjoni fotosintetikament attiva), fotoperjodu, temperaturi massimi/minimi, skeda u metodu tat-tisqija, fertilizzazzjoni;
- numru ta' żrieragħ f'kull qasrija, numru ta' pjanti għal kull doża, numru ta' repliki (qsari) għal kull rata ta' espożizzjoni;
- tip u numru ta' kontrolli (kontrolli negattivi u/jew pożittivi, kontroll tas-solvent jekk jintuża);
- durata tat-test.

Riżultati:

- tabella tal-punti tat-tmiem kollha għal kull replikat, il-koncentrazzjoni/rata tat-test u l-ispeċijiet;
- in-numru u t-tfaċċar perċentwali meta mqabbel mal-kontrolli;
- il-kejl tal-bijomassa (piż xott jew piż frisk tan-nebbieta) tal-pjanti bħala perċentwal tal-kontrolli;

▼ M6

- l-gholi tan-nebbieta tal-pjanti bħala l-perċentwal tal-kontrolli, jekk imkejjeġ;
- dannu viżwali perċentwali u deskrizzjoni kwalitattiva u kwantitattiva tad-dannu viżwali (klorozi, nekrozi, dbiel, deformazzjoni tal-weraq u z-zokk, kif ukoll kwalunkwe nuqqas ta' effetti) mis-sustanza kimika tat-test meta mqabbel mal-pjanti ta' kontroll;
- deskrizzjoni tal-iskala tal-klassifikazzjoni użata biex jiġi ġġudikat id-dannu viżwali, jekk tiġi pprovduta klassifikazzjoni viżwali;
- għal studji tar-rata unika, għandu jiġi rrapportat id-dannu perċentwali;
- Il-valuri EC_x jew ER_x (eż. EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) u l-limiti ta' kunfidenza relatati. Meta titwettagħ l-analiżi tar-rigressjoni, ipprovi l-iżball standard għall-ekwazzjoni tar-rigressjoni, u l-iżball standard għall-istima tal-parametru individwali (eż. il-pendil, l-interċetta);
- il-valuri NOEC (u LOEC) jekk jiġu kkalkolati;
- deskrizzjoni tal-proċeduri statistiki u l-preżunzjonijiet użati;
- wiri grafiku ta' din id-dejta u r-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons tal-ispeċijiet ittestjati.

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenzi matul it-test.

DOKUMENTAZZJONI

- (1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.
- (3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Soil Quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora — Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:
 - 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;
 - 850.4025: Target Area Phytotoxicity;
 - 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);
 - 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;
 - 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;
 - 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- (8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼ M6

- (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.
- (10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.
- (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.
- (13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
- (14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
- (15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.
- (16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174
- (17) Boutin, C., Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
- (18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.
- (19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.
- (20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J.. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.
- (21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.
- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.
- (24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) *Research Methods in Weed Science*, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
- (25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.
- (26) Kapitulu C.33 ta' dan l-Anness: Test tar-Riproduzzjoni tal-Hniex (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Ingredjent attiv (a.i.) (jew sustanza attiva (a.s.)) huwa materjal imfassal biex jipprovdi effett bijoloġiku speċifiku (eż. kontroll tal-insetti, kontroll tal-mard tal-pjanti, kontroll tax-xibt fl-erja tat-trattament), magħruf ukoll bħala l-ingredjent attiv tal-grad tekniku, sustanza attiva.

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

Prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti (CPPs jew PPPs) jew pestiċidi huma materjali b'attività bijoloġika speċifika użati b'mod maħsub biex jipproteġu l-pjanti minn pesti (eż. mard fungali, insetti u pjanti kompetittivi).

EC_x, Konċentrazzjoni tal-Effett ta'x % jew ER_x, Rata tal-Effett ta' x % hija l-konċentrazzjoni jew ir-rata li tirriżulta f'bidla mhux mixtieqa ta' x % fil-punt tat-tmiem finali tat-test li jitkejjel b'mod relattiv għall-kontroll (eż. 25 % jew 50 % tnaqqis fit-tfaċċar ta' nebbiet, piż tan-nebbiet, numru finali ta' pjanti preżenti, jew zieda fid-dannu viżwali jikkostitwixxi EC₂₅/ER₂₅ jew EC₅₀/ER₅₀ rispettivament).

Tfaċċar hija d-dehra ta' koleottili jew kotiledon fuq wiċċ il-ħamrija.

Formulazzjoni hija l-prodott formulat kommerċjalment li fih is-sustanza attiva (ingredjent attiv), magħrufa wkoll bħala l-preparazzjoni finali⁽¹⁾ jew prodott għall-użu finali (TEP) tipiku.

LOEC (Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn ġie osservat effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għal-LOEC, għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll, u hija oghla mill-valur NOEC.

Pjanti mhux fil-mira: Dawk il-pjanti li mhumiex fl-erja tal-pjanti fil-mira. Għal prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, dan ġeneralment jirreferi għall-pjanti li ma jagħmlux parti mill-erja tat-trattament.

NOEC (Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn ma ġie osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Fitotossicità: Devjazzjonijiet detrimentali (b'valutazzjonijiet imkejla u viżwali) mill-mudell normali ta' dehra u tkabbir ta' pjanti b'rispons għal sustanza kimika partikolari.

Replikati huwa l-unità sperimentali li tirrappreżenta l-grupp ta' kontroll u/jew il-grupp ta' trattament. F'dawn l-istudji, il-kontenitur huwa ddefinit bħala r-replikati.

Valutazzjoni viżwali: Klassifikazzjoni tad-dannu viżwali abbażi tal-osservazzjonijiet tal-istand tal-pjanta, il-vigor, il-malfurmazzjoni, il-klorożi, in-nekrożi, u dehra ġenerali wara paragun ma' kontroll.

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

⁽¹⁾ Preparazzjoni Finali: Il-prodott formulat li fih is-sustanza attiva (ingredjent attiv) mibjugħ fis-suq.

▼ **M6**

Appendiċi 2

Lista ta' speċijiet storikament użati fl-ittestjar tal-pjanti

Familja	Speċi	Ismijiet komuni
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Karrotti
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Ġirasol
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Hassa
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Mustarda Bajda
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Kaboċċa ċiniża
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Kolza
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Kaboċċa
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Neview
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Krexixuni tal-ġnien
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Ravanell
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Pitravi
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Hjara
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max (G. soja)</i>	Fażola tas-sojja
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Fażola mung
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dwarf bean, Fażola Fran- ċiża, Fażola tal-ġnien
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Pizelli
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum- graecum</i>	Żerriegħa tal-fienu
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Qrempuċ tal-mogħoż
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Silla Hamra
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Ġulbiena
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Kittien
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Qamħ saraċin
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Tadam

▼ **M6**

Familja	Speċi	Ismijiet komuni
<i>MONOCOTYLEDONAE</i>		
Liliaceae (Amarylladaceae)	<i>Allium cepa</i>	Basal
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Ħafur
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Xghir
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Sikran perenni
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Ross
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Segala
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Grain Shattercane sorghum,
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Qamħ
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Qamħirrum

Lista ta' speċijiet li potenzjalment mhumiex pjanti

Speċijiet Potenzjali tal-OECD għall-Ittestjar tat-Tossicità tal-Pjanti.

Nota: It-tabella li ġejja tipprovdi informazzjoni għal 52 speċi li mhumiex pjanti (jinghataw referenzi fil-parentezi għal kull entrata). Ir-rati ta' tfaċċjaw pprovduti huma minn dokumentazzjoni ppubblikata u huma għal gwida ġenerali biss. L-esperjenza individwali tista' tiddependi skont is-sors taż-żerriegħa u fatturi oħra.

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Inġliż)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-germinazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Germinazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossicità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi oħrajn ⁽⁸⁾
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (Tursin tas-Sgajra Ġappuniża)	A, B żoni disturbati, ringieli ta' sgajriet, merghat (16, 19)	1,7-1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratifikazzjoni bil-kesha (7, 14, 18, 19) jaf tkun mehtieġa maturazzjoni (19) germinazzjoni inibita mid-dlam (1, 19) l-ebda trattament speċjali (5)	WARA (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (Lellux Inġliż)	P bur, għelieqi li jinhartu, terf (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	il-germinazzjoni mhijiex affettwata mill-irradjanza (18, 19) l-ebda trattament speċjali (4, 14)	WARA (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (Wardet il-Qamh)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq, habitats miftuħa (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	l-ebda trattament speċjali (2, 4)	WARA (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (Ċentawrja Sewda)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, habitats miftuħa (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	jaf tkun mehtieġa maturazzjoni (18, 19) germinazzjoni inibita mid-dlam (19) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 26)	WARA (5, 22, 26)	A	
<i>Inula h elenium</i> Elecampane	P siti disturbati, umdi (16)	1-1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	A, F	

▼ M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliz)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Zerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossiċità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi ohrajn ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (Sinnet il-Ljun)	P għelieqi, ġniebi tatoroq, żoni disturbati (16, 19)	0,85-1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (17, 18, 19) l-ebda trattament speċjali (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (Black-eyed Susan)	B, P disturbata (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	l-ebda trattament speċjali (4, 14, 33)	WARA (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> Virga tad-Deheb Kanadiża	P mergħa, żoni miftuħa (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	hallat b'parti ugħwali ta' ramel u xarrab f'500 ppm għal 24 siegħa (11) l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (Agrimonja Komuni)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		ġerminazzjoni tista' tiġi inibita mid-dlam (1) xarrab f'ilma shun għal 12-il siegħa (29)	QABEL U WARA (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (Agrimonja Spinuża)	A ħabitats miftuħa (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		brix (14) l-ebda trattament speċjali (6)	QABEL U WARA (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (Agrimonja Taljana)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		l-ebda trattament speċjali (6, 14, 21)	QABEL U WARA (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (Kardamina)	P għelieqi, ġniebi tatoroq, terf (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22)	WARA (5, 22)	F	

▼ M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Inġliż)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Zerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossiċità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Zrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi ohrajn ⁽⁸⁾
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (Fjur Kukulu)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (18) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 15, 22-26)	WARA (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPODIACEAE <i>Chenopodium album</i> (Tigieġa Hoxna)	A margini tal-ġhelieqi, żoni disturbati (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	it-trattament huwa differenti skont il-kulur taż-zerriegħa (19) irqad fi hżien xott (19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 18, 19) stratifikazzjoni bil-kesħa (18) l-ebda trattament speċjali (14, 34)	QABEL U WARA (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (Fexfiex Komuni)	P ġhelieqi, art li tinħarat, habitats miftuħa (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L= D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 18, 19) l-ebda trattament (5, 14, 15, 25, 27)	WARA (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (Ipomea Vjola)	A ġniebi tat-toroq, habitats miftuħa, ġhelieqi tal-qamħirrum (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (6, 21)	QABEL U WARA (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (Nutsedge Vjola)	P art li tinħarat, merghat, ġniebi tat-toroq (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (6, 10, 14)	QABEL U WARA (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (Għantqux)	P ġhelieqi bil-haxix, ġniebi tat-toroq, habitats miftuħa (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	brix (14, 19) il-ġerminazzjoni mhijiex affettwata mill-irradjanza (18, 19) l-ebda trattament speċjali (23, 25)	WARA (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼ M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliz)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Zerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossicità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Zrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi ohrajn ⁽⁸⁾
<i>Senna obtusifolia</i> (Kassja, Sicklepod)	A boskijiet umdi (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		xarrab iż-żrieragħ fl-ilma għal 24 siegħa (9) brix (14) il-vijabbiltà taż-zerriegħa hija differenti skont il-kulur (1) l-ebda trattament speċjali (6)	WARA (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (Qanneb)	A ħamrija alluvjali (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		xarrab iż-żrieragħ fl-ilma għal 24 siegħa (9) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (21)	QABEL U WARA (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (Xnien Aħmar)	P għelieqi, ġniebi tatoroq, art li tinħarat (16, 19)	1,4-1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	brix (14, 18) jaf tkun teħtieġ maturazzjoni (19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1, 19) l-ebda trattament speċjali (5)	WARA (5)	A, E, F	
LAM IAC E AE <i>Leonurus cardiaca</i> (Motherwort)	P żoni miftuħa (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		l-ebda trattament speċjali (4, 14)	WARA (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (Nagħniegħ)	P żoni umdi (16)	2,21 (4)		0 (4)		l-ebda trattament speċjali (4)	WARA (4)	F	
<i>Nepeta cataria</i> (Haxixet il-Qtates)	P erjas disturbati (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		l-ebda trattament speċjali (2, 4, 14)	WARA (2,4)	F	

▼ M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliz)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Zerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossiċità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi ohrajn ⁽⁸⁾
<i>Prunella vulgaris</i> (Prunella)	P għelieqi li jinħartu, żoni bil-ħaxix, siti disturbati (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) ġerminazzjoni ikbar b'żrieragħ ikbar (1) l-ebda trattament speċjali (4, 14, 22)	WARA (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (Hurrieg irqiq)	P mergħat, margini tal-għelieqi (19)	14–18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22)	WARA (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilon theophrasti</i> (Werqa bellusija)	A għelieqi, habitats miftuħa (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	brix (14) l-ebda trattament (5, 10, 21)	QABEL U WARA (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (Prickly Sida)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		brix (14) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (6, 21)	QABEL U WARA (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (Peprin)	A għelieqi, art li tinharat, siti miftuħa (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratifikkazzjoni bil-kesħa u brix (1, 19, 32) l-ebda trattament (4, 14, 29)	WARA (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (Agrositis Komuni)	ħaxix, mergħat (16)	0,07 (14)	L > D (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1, 17-19) l-ebda trattament speċjali (10)	WARA (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (Denb il-Volpi)	A għelieqi, habitats miftuħa (16)	0,9–1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	brix (14) ittratta b'101 mg/L KNO ₃ (14) stratifikazzjoni bis-ħana (1) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (34)	QABEL U WARA (28, 34)	A	32

▼ M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Ingliż)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Zerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossiċità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi oħrajn ⁽⁸⁾
<i>Avena fatua</i> (Hafur Selvaġġ)	A żoni kkultivati, habitats miftuħa (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	brix (7, 32) id-dlam jinibixxi l-ġerminazzjoni (1) brix bil-kesħa (1, 18) l-ebda trattament speċjali (6, 10, 14)	QABEL U WARA (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (Bunixxief)	A għelieqi, ġniebi tat-toroq, art li tinharat (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		perjodu ta' maturazzjoni (1, 7, 32) ġerminazzjoni inibita mid-dawl (1) l-ebda trattament speċjali (14)	QABEL U WARA (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (Haxix Denb il-Kelb)	P għelieqi, ġniebi tat-toroq, habitats miftuħa (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	ġerminazzjoni mhux affettwat mill-irradjanza (19) l-ebda trattament speċjali (14, 29)	WARA (5)	A	
<i>Digitaria sanguinalis</i> (Diġitarja)	A għelieqi, terf, habitats miftuħa (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) (14) 14 (94 %) (7)	brix, stratifikazzjoni bil-kesħa, u maturazzjoni (1, 7, 14, 32) ittratta b'101 mg/L KNO ₃ (14) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1) l-ebda trattament speċjali (21)	QABEL U WARA (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (Haxix tar-Razzett)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		brix (7, 32) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) l-ebda trattament speċjali (3, 14, 21)	QABEL U WARA (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (Segala Selvaġġa Kanadiza)	P riparjani, siti disturbati (16)	4–5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	l-ebda trattament speċjali (2, 11)	WARA (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (Żwien)	P għelieqi, żoni umdi (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	l-ebda trattament speċjali (10, 19)	WARA (10)	A	7

▼ M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Inġliż)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Zerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossiċità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi ohrajn ⁽⁸⁾
<i>Hordeum pusillum</i> (Xgħir Żgħir)	A mergħat, ġniebi tat-toroq, ħabitats miftuħa (16)	3,28 (14)				stratifikazzjoni bis-shana (1) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1)	QABEL (31)		7
<i>Phieum pratense</i> (Haxix tal-Għalf)	P mergħat, għelieqi li jinħartu, siti disturbati (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (17) l-ebda trattament speċjali (10, 14, 17, 19)	WARA (10)	A, E	
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (Leblieba Hadra)	A ħabitats miftuħa, ġnub tat-toroq (16)	5–8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		stratifikazzjoni bil-kesha għal 4 — 8 ġimgħat (1, 2, 4, 20, 29) ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1)	QABEL U WARA 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (Persikarja)	A ħamrija umda (16)	1,8–2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	ġerminazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (1) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (18) statifikazzjoni bil-kesha (1) l-ebda trattament speċjali (5)	QABEL U WARA (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (Pennsylvania Smartweed)	A għelieqi, ħabitats miftuħa (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		stratifikazzjoni bil-kesha għal 4 ġimgħat f0 — 5oC (1, 29) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (1)	QABEL (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (Smartweed)	A żoni disturbati, art li tinħarat (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	brix, stratifikazzjoni bil-kesha, trattament GA (14) stratifikazzjoni bil-kesha, maturazzjoni (17-19) ġerminazzjoni inibita mid-dlam (19) l-ebda trattament speċjali (13)	WARA (13)	A	32

▼ **M6**

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Inġliż)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Żerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-germinazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Germinazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossiċità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Żrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi ohrajn ⁽⁸⁾
<i>Rumex crispus</i> (Qarsajja Nnuklata)	P għelieqi li jinħartu, ġniebi tat-toroq, żoni miftuħa (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	germinazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) jaf tkun meħtieġa maturazzjoni (18) l-ebda trattament speċjali (4, 14, 33)	WARA (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (Harira Hamra)	A għelieqi li jinħartu, żoni miftuħa, siti disturbati (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	stratifikkazzjoni bil-kesha, trattament GA (1, 14, 18, 19, 32) dawl meħtieġ għall-germinazzjoni (1) l-ebda trattament speċjali (2, 4)	WARA (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (Qarsu Komuni)	P għelieqi li jinħartu, ġniebi tat-toroq, żoni miftuħa (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 24 -26)	WARA (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (Ġeum Isfar)	P ringieli ta' sġajriet, żoni umdi (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	germinazzjoni inibita mid-dlam (18, 19) stratifikazzjoni bis-shana (1) l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 25, 26)	WARA (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (Harxaja Komuni)	A għelieqi li jinħartu, żoni umdi, siti disturbat (16, 19)	7–9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratifikkazzjoni bil-kesha (1, 18, 19) germinazzjoni mhux affettwata mill-irradjanza (18, 19) id-dawl jimibixxi l-germinazzjoni (1) l-ebda trattament speċjali (6, 14)	QABEL U WARA (6, 28)	A	32

▼ M6

FAMILJA Isem Botaniku tal-Ispeċi (Isem Komuni Inġliż)	Tul ta' hajja ⁽¹⁾ u Habitat	Piż taż-Zerriegħa (mg)	Fotoperjodu għall-ġerminazzjoni jew it-tkabbir ⁽²⁾	Fond tat-Tahwil (mm) ⁽³⁾	Żmien għall-Ġerminazzjoni (jiem) ⁽⁴⁾	L-ebda trattament speċjali ⁽⁵⁾	Test tat-Tossicità ⁽⁶⁾	Fornituri taż-Zrieragħ Iċċitati ⁽⁷⁾	Referenzi ohrajn ⁽⁸⁾
<i>Galium mollugo</i> (Harxajja tal-Kannizzati)	P sisien tal-haxix, żoni miftuħa (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		l-ebda trattament speċjali (5, 14, 22, 24, 26, 29)	WARA (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (Diġitalis)	sisien tal-hitan B,P, żoni miftuħa (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid- dlam (1, 17-19) l-ebda trat- tament speċjali (4, 22-26)	WARA (4, 22, 26)	D, G, F	
<i>Veronica persica</i> (Veronika)	A għelieqi li jinhartu, żoni miftuħa, siti disturbati (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	ġerminazzjoni inibita mid- dlam (18, 19) stratifikazzjoni bil-kesha (18) l-ebda tratta- ment speċjali (14)	QABEL U WARA (28)	A	32

⁽¹⁾ A = Pjanti annwali, B = Pjanti biennali, P = Pjanti perenni.

⁽²⁾ Referenzi 11,14 u 33 jirreferu għall-proporzjon ta' dawl (L) u dlam (D) mehtieg biex tiġi indotta ġerminazzjoni taż-zerriegħa. Referenzi 3, 6, 9, 10, 13, 20 jirreferu għalkundizzjonijiet ta' tkabbir fis-serer.

⁽³⁾ 0 mm jindika li ż-zerriegħa nzerghu fuq wiċċ il-hamrija jew li ż-zerriegħa jehtiegu d-dawl biex jiġġerminaw.

⁽⁴⁾ In-numri pprovduti jirrappreżentaw in-numru ta' jiem fejn perċentwal ta' żrieragħ iġġerminati skont ir-referenza pprovduta, eż. 3 ijiem (50 %) ġerminazzjoni (referenza19).

⁽⁵⁾ It-tul ta' maturazzjoni u jew is-stratifikazzjoni mhumix dejjem disponibbli. Hlief għar-rekwiziti tat-trattament bil-kesha, il-kundizzjonijiet tat-temperatura mhumix speċifikati peress li fl-ittestjar tas-serer hemm kontroll ta' temperatura limitata. Il-biċċa l-kbira taż-żrieragħ sejin jiġġerminaw f'varjazzjoni normali tat-temperaturi misjuba fis-serer.

⁽⁶⁾ Tindika speċi li kienet utilizzata f'test tat-tossicità tal-pjanta qabel it-tfaċċar (QABEL) u/jew wara t-tfaċċar (WARA) li jinvolvi erbicidi.

⁽⁷⁾ Tipprovdi eżempju/eżempji ta' fornituri ta' żrieragħ kummerċjali.

⁽⁸⁾ Tipprovdi żewġ referenzi alternattivi li ġew ikkonsultati.

▼ **M6****Fornituri taż-Żrieragh Iċċitati**

ID tal-Fornitur	Informazzjoni dwar il-Fornitur
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 — 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 — 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chilternseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274-7333 www.thompson-morgan.com

REFERENZI ĊĊITATI

- (1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto
- (2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). *Ecotoxicology*, 12:271-285.
- (3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 19(10):2532-2541.
- (4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. *Ecotoxicology*, 13:349-369.
- (5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Annals of Applied Biology*, 121:669-677.
- (6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: *Plants for toxicity assessment: 2nd volume*. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pp 197 — 208.

▼ **M6**

- (7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.
- (8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pp. 151 — 156.
- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)
- (12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- (14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid)
- (15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- (17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London
- (20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.
- (22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

▼ **M6**

- (26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
- (27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. *BCPC — Weeds*. pp. 1021-1028.
- (28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
- (29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (<http://www.herbiseed.com>)
- (30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
- (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].
- (32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
- (33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.
- (34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.

▼ **M6***Appendiċi 4***Eżempji għal kundizzjonijiet ta' tkabbir xierqa għal ċerti speċijiet ta' pjanti**

Il-kundizzjonijiet li ġejjin instabu li huma xierqa għal 10 speċijiet ta' pjanti, u jistgħu jintużaw bħala gwida għal testijiet f'ċerti kompartimenti ta' tkabbir b'ċerti speċijiet ohra wkoll:

Konċentrazzjoni tad-dijossidu tal-karbonju: 350 ± 50 ppm;

Umdità relattiva: 70 ± 5 % matul perjodi ta' dawl u 90 ± 5 % matul perjodi fid-dlam;

Temperatura: 25 ± 3 °C matul il-jum, 20 ± 3 °C matul il-lejl;

Fotoperjodu: 16-il siegħa dawl /8 siegħa dlam, meta wiehed jassimi tul ta' mewġa medja ta' 400 sa 700 nm;

Dawl: luminanza ta' 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, imkejla fil-parti ta' fuq tal-kopertura.

L-ispeċijiet ta' pjanti huma:

- tadam (*Solanum lycopersicon*);
- ħjar (*Cucumis sativus*);
- ħass (*Lactuca sativa*);
- fażola tas-sojja (*Glycine max*);
- kaboċċi (*Brassica oleracea* var. *capitata*);
- zunnarija (*Daucus carota*);
- ħafur (*Avena sativa*);
- sikrana perenni (*Lolium perenne*);
- qamħirrum (*Zea mays*);
- basla (*Allium cepa*).

▼ M6

C.32. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-ENCHYTRAEID

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar tal-OECD (TG) 220 (2004). Huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-produzzjoni riproduttiva tad-dudu enchytraeid, *Enchytraeus albidus* Henle 1873, fil-hamrija. Huwa bbażat prinċipalment fuq metodu żviluppat minn Umweltbundesamt, il-Ġermanja (1) li sarlu ring test (2). Gew ikkunsidrati wkoll metodi oħra għall-ittestjar tat-tossiċità tas-sustanzi kimiċi għal Enchytraeidae u l-hniex (3)(4)(5)(6)(7)(8).

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

2. L-annelidi li jgħixu fil-hamrija tal-ġeneru *Enchytraeus* huma speċijiet ekoloġikament rilevanti għall-ittestjar ekotossikoloġiku. Filwaqt li l-enchytraeids, hafna drabi jinstabu fil-hamriji li fihom il-hniex, huwa veru wkoll li hafna drabi huma abundanti f'diversi hamriji fejn ma jinstabux il-hniex. Enchytraeids jistgħu jintużaw f'testijiet tal-laboratorju kif ukoll fi studji prattiċi u semiprattiċi. Minn perspettiva prattika, hafna speċijiet ta' *Enchytraeus* huma faċli biex jiġu mmanigġati u jitmissu, u ż-żmien għall-ġenerazzjoni tagħhom huwa ferm iqsar milli għall-hniex. It-tul għal test tar-riproduzzjoni b'enchytraeids huwa għalhekk biss 4-6 ġimghat filwaqt li għall-hniex (*Eisenia fetida*) huwa ta' 8 ġimghat.
3. Informazzjoni bażika dwar l-ekoloġija u l-ekotossikoloġija ta' enchytraeids fl-ambjent terrestri tista' tinstab f'(9)(10)(11)(12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Il-hniex enchytraeid adulti huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imhallta ma' hamrija artifiċjali. It-test jista' jinqasam f'żewġ stadji: (a) test tas-sejba tal-medda, f'każ li tkun disponibbli biżżejjed informazzjoni, fejn il-mortalità hija l-punt ta' tmiem ivvalutata wara espożizzjoni ta' ġimagħtejn u (b) test tar-riproduzzjoni finali fejn huwa vvalutat in-numru totali ta' frieh prodotti mill-annimal ġenitur u s-sopravivenza tal-annimali ġenituri. It-tul tat-test finali huwa sitt ġimghat. Wara l-ewwel tliet ġimghat, id-dud adult jitneħħa u jiġu rreġistrati l-bidliet morfoloġiċi. Wara tliet ġimghat oħra, jingħadd in-numru ta' frieh, imfaqqsa mill-fosdqiet prodotti mill-adulti. Il-prodozzjoni riproduttiva tal-annimali esposti għas-sustanza kimika tat-test titqabbel ma' dik tal-kontroll(i) sabiex tiġi ddeterminata (i) il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u/jew (ii) EC_x (eż. EC_{10} , EC_{50}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża tnaqqis ta' x % fil-produzzjoni riproduttiva. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakitjaw l- EC_x (eż. EC_{10} , EC_{50}) biex b'hekk l- EC_x imbagħad johroġ mill-interpolazzjoni iktar milli l-estrapolazzjoni.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

5. Is-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow} , il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma tal-hamrija (eż. Kapitolu C.18 jew C.19 ta' dan l-Anness) u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test għandhom preferibbilment ikunu magħrufa. Hija rakkomandabbli informazzjoni addizzjonali dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija, bħar-rati ta' fotolisi u idrolisi.
6. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għal sustanzi kimiċi li jinhallu fl-ilma jew li ma jinhallux fl-ilma. Madankollu, il-mod ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ser ivarja kif xieraq. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni arja/ilma huwa ikbar minn wiehied, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

▼ M6**VALIDITÀ TAT-TEST**

7. Sabiex it-test ikun validu, ghandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' prestazzjoni li ġejjin fil-kontrolli:
- il-mortalità tal-adulti ma ghandhiex taqbeż l-20 % fi tmiem it-test tas-sejba tal-medda u wara l-ewwel tliet ġimgħat tat-test tar-riproduzzjoni.
 - jekk wiehed jassumi li ntużaw 10 adulti f'kull reċipjent fil-konfigurazzjoni tat-test, medja ta' mill-anqas 25 frieh f'kull reċipjent kellha tiġi prodotta fi tmiem it-test.
 - il-koeffiċjent ta' varjazzjoni madwar in-numru medju ta' frieh ghandu jkun oghla minn 50 % fi tmiem it-test tar-riproduzzjoni.

Fejn test jonqos milli jissodisfa l-kriterji ta' validità ta' hawn fuq, it-test ghandu jiġi tterminat sakemm ma tkunx tista' tiġi pprovduta ġustifikazzjoni biex isir it-test. Il-ġustifikazzjoni ghandha tiġi inkluzi fir-rapport tat-test.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

8. Sustanza kimika ta' referenza ghandha tiġi ttestjata f'intervalli regolari jew possibbilment inkluzi f'kull test biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organizmi tat-test ma nbidilx wisq maż-żmien. Sustanza kimika ta' referenza xierqa hija karbendażim, li ntweriet li taffettwa s-sopravivenza u r-riproduzzjoni ta' enchytraeids (13)(14), jew jistgħu jintużaw ukoll sustanzi kimiċi oħra li d-dejta tat-tossicità tagħhom hija magħrufa sew. Formulazzjoni ta' karbendażim magħrufa bl-isem kummerċjali ta' Derosal TM fornita minn AgrEvo Company (Frankfurt, il-Germanja) u li fiha 360 g/l (32,18 %) ingredjent attiv intużat f'ring test (2). L-EC₅₀ għar-riproduzzjoni ddeterminata fir-ring test kienet fil-medda ta' 1,2 ± 0,8 mg ingredjent attiv (a.i) /kg massa xotta (2). Jekk standard tat-tossicità pożittiv huwa inkluz fis-serje tat-test, tintuża konċentrazzjoni waħda u n-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak fil-kontrolli. Għal karbendażim, huwa rakkomandat l-ittestjar ta' 1,2 mg a.i./kg piż xott (ittestjat bħala formulazzjoni likwida).

DESKRIZZJONI TAT-TEST**Tagħmir**

9. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu magħmula mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti iehor. Vazetti tal-ħġieġ (eż. volum: 0,20 — 0,25 litru; dijametru: ≈ 6 cm) huma xierqa. Ir-reċipjenti għandu jkollhom ghotjien trasparenti (eż. ħġieġ jew polietilen) li huma ddisinjati biex inaqqsu l-evaporazzjoni tal-ilma filwaqt li jippermettu l-iskambju tal-gass bejn il-hamrija u l-atmosfera. Dawn l-ghotjien għandhom ikunu trasparenti biex jgħaddi d-dawl minnhom.
10. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:
- armadju tat-tnixxif;
 - sterjomikroskopju;
 - miter tal-pH u fotometru;
 - imwieżen preċiżi xierqa;
 - tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;
 - tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni jkollhom l-ghotjien);
 - inkubatur jew kamra żgħira b'arja kondizzjonata;
 - pinzetti, gancijiet jew ingassi;
 - photo basin.

Preparazzjoni tal-hamrija artifiċjali

11. F'dan it-test tintuża hamrija artifiċjali (5)(7) bil-kompożizzjoni li ġejja (abbazi tal-piżijiet xotti, li titmixxef għal piż kostanti ta' 105 °C):

▼ M6

- 10 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u mithun irqiq (daqs tal-frak ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli); huwa rakkomandat li jiġi vverifikat li hamrija mhejjija b'lott ġdid ta' pit hija xieraqa għall-kulturi tad-dud qabel tintuża f'test;
- 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);
- madwar 0,3 sa 1,0 % karbonat tal-kalċju (CaCO_3 , pulverizzat, grad analitiku) biex tinkiseb pH ta' $6,0 \pm 0,5$; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiżdied jiddependi l-iktar fuq il-kwalità/natura tal-pit;
- madwar 70 % ramel kwarzuż imnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' CaCO_3 mehtieg), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron.

Huwa rakkomandabbli li tintwera l-adegwatezza ta' hamrija artifiċjali għall-kulturi tad-dud u għall-ilhuq tal-kriterji tal-validità tal-ittestjar qabel tintuża l-hamrija f'test finali. Huwa speċjalment rakkomandat li ssir tali verifika biex jiġi żgurat li l-prestazzjoni tat-test ma tkunx f'riskju jekk jitnaqqas il-kontenut ta' karbonju organiku tal-hamrija artifiċjali, eż. billi jitnaqqas il-kontenut ta' pit għal 4-5 % u jiżdied il-kontenut ta' ramel kif xieraq. B'tali tnaqqis fil-kontenut tal-karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test mill-hamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test għad-dud tista' tizdied. Intwera li *Enchytraeus albidus* jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità dwar ir-riproduzzjoni meta jiġi ttestjat f'hamrija tal-ghelieqi b'kontenut ta' karbonju organiku iktar baxx milli ntqal hawn fuq (eż. 2,7 %) (15), u hemm esperjenza — għalkemm limitata — li dan jista' jintlaħaq ukoll f'hamrija artifiċjali b'5 % pit.

Nota: Meta tintuża hamrija naturali f'ittestjar (eż. ta' livell oġġla) addizzjonali, għandha tintwera ukoll l-adegwatezza tal-hamrija u l-ilhuq tal-kriterji tal-validità tat-test.

12. Il-kostitwenti xotti tal-hamrija jithalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira). Dan għandu jsir tal-inqas darba f'gimgha qabel il-bidu tat-test. Il-hamrija mhallta għandha tinhażen għal tal-inqas jumejn sabiex tiġi ekwibrata/stabbilizzata l-aċidità. Għad-determinazzjoni tal-pH, tintuża tahlita ta' hamrija u 1 M klorur tal-potassju (KCl) jew 0,01 M soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju (CaCl_2) f'proporzjon ta' 1:5 (ara (16) u Appendiċi 3). Jekk il-hamrija hija iktar aċidika mill-medda mehtieġa (ara l-paragrafu 11), tista' tiġi aġġustata biż-żieda ta' ammont xieraq ta' CaCO_3 . Jekk il-hamrija hija alkalina wisq tista' tiġi aġġustata billi tizdied iktar tahlita, li ssir referenza għaliha fil-paragrafu 11, iżda li teskludi s- CaCO_3 .
13. Il-kapaċità ta' zamma tal-ilma (WHC) massima tal-hamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2. Jum jew jumejn qabel il-bidu tat-test, il-hamrija artifiċjali xotta tixxarrab minn qabel billi jiżdied biżżejjed ilma mhux dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut finali tal-ilma, li huwa ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità massima ta' zamma tal-ilma. Fil-bidu tat-test, il-hamrija mxarrba minn qabel tinqasam fi porzjonijiet li jikkorrispondu għan-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test (u s-sustanza kimika ta' referenza fejn ikun xieraq) u l-kontrolli użati għat-test.

▼ M6

Il-kontenut ta' umdità huwa aġġustat għal 40-60 % tad-WHC massima biż-zieda tas-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew biż-zieda ta' ilma distillat jew dejonizzat (ara l-paragrafi 19-21). Il-kontenut ta' umdità huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test (billi jitnixxef għal piż kostanti f'105°C) u għandu jkun fi hdan l-aħjar medda għas-sopravivenza tad-dud. Verifika approssimattiva tal-kontenut ta' umdità fil-hamrija tista' tinkiseb billi l-hamrija tinghasar bil-mod fl-idejn, jekk il-kontenut ta' umdità jkun tajjeb, għandhom jidhru qtar żgħir tal-ilma bejn is-swaba.

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

14. L-ispeċi tal-ittestjar rakkomandata hija *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (potworm abjad), membru tal-familja *Enchytraeidae* (ordni *Oligochaeta*, phylum *Annelida*). *E. albidus* hija waħda mill-akbar speċijiet ta' enchytraeids, bir-reġistrazzjoni ta' kampjuni sa 35 mm f'tul (17)(18). *E. albidus* għandha distribuzzjoni dinjija u tinstab fil-habitats tal-baħar, tal-ilma helu u terrestri, prinċipalment f'materja organika li tkun qiegħda titmermer (makroalgi tal-baħar, kompost) u rament f'merghat (9). It-tolleranza ekoloġika wiesgħa tagħha u xi varjazzjonijiet morfoloġiċi jaf jindikaw li jeżistu razzi differenti.
15. *E. albidus* hija kummerċjalment disponibbli, bhala ikel għall-hut. Għandu jiġi vverifikat jekk il-kultura hijiex kontaminata minn speċijiet oħrajn, ġeneralment iżgħar (1) (19). Jekk ikun hemm kontaminazzjoni, id-dud kollu għandu jitlahlah bl-ilma f'dixx petri. Imbagħad għandhom jintgħażlu kampjuni ta' adulti kbar ta' *E. albidus* (permezz ta' sterjomikroskopju) biex tinbeda kultura ġdida u d-dud l-ieħor kollu jintrema. *E. albidus* tista' titrabba faċilment f'firxa wiesgħa ta' materjali organiċi (ara l-Appendiċi 4). Iċ-ċiklu tal-hajja ta' *E. albidus* huwa qasir peress li tilhaq il-maturità bejn it-33 jum (f'18 °C) u l-74 jum (f'12 °C) (1). Għat-test sejrini jintużaw biss daww il-kulturi li nżammu mingħajr problemi fil-laboratorju għal tal-inqas 5 ġimgħat (ġenerazzjoni waħda).
16. Huma xierqa wkoll speċijiet oħra tal-ġeneru *Enchytraeus*, pereżemju *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 jew *E. crypticus* Westheide u Graefe 1992 (ara l-Appendiċi 5). Jekk jintużaw speċijiet oħra ta' *Enchytraeus*, dawn għandhom jiġu identifikati b'mod ċar u għandu jiġi rrapportat ir-raġunament wara l-għażla tal-ispeċijiet.
17. L-annimali użati fit-testijiet huma dud adult. Dawn għandu jkollhom bajd (tikek bojod) fir-reġjun tal-klitellu, u għandhom ikollhom bejn wiehded u ieħor l-istess daqs (tul ta' madwar 1 cm). Mhijiex meħtieġa sinkronizzazzjoni tal-kultura tat-tneissil.
18. Jekk l-enchytraeids ma jitneisslux fl-istess tip ta' hamrija u fl-istess kundizzjonijiet (inkluz it-tagħlif) użati għat-test finali, dawn għandhom jiġu akklimatizzati għal tal-inqas 24 siegħa u sa tliet ijiem. Inizjalment għandu jiġi akklimatizzat numru kbir ta' adulti minn daww meħtieġa għat-twettiq tat-test biex ikun hemm skop għar-rifjut tal-kampjuni danneġġati jew inkella mhux adattati. Fi tmiem il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, jintgħażel biss id-dud li fih il-bajd u li ma jesebixxi ebda anomalija fl-imġiba (eż. jipprova jħrab mill-hamrija) għat-test. Id-dud jitneħħa b'attenzjoni permezz ta' pinzetti, gancijiet jew holoq tal-ġojjellier u jitqiegħed f'dixx petri li jkun fih ammont żgħir ta' ilma helu. Ilma frisk rikostitwit kif propost fil-Kapitolu C.20 ta' dan l-Anness (Test tar-Riproduzzjoni *Daphnia magna*) huwa preferut għal dan il-fini peress li ilma tal-vit dejonizzat u demineralizzat jaf ikun ta' ħsara għad-dud. Id-dud jiġu spezzjonati taħt sterjomikroskopju u dak li ma jkollux bajd jintrema. Kwalunkwe dud irqi jew springtail li jaf infetta l-kulturi jitneħħa jew jintrema b'attenzjoni. Dud b'saħħtu li ma jintużax għat-test jerga' jitpoġġa fil-kultura ewlenija.

▼ **M6****Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test***Sustanza kimika tat-test li tinhall fl-ilma*

19. Tiġi ppreparata soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'ilma dejonizzat f'kwantità suffiċjenti għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni tat-test waħda. Huwa rakkomandat li tintuża kwantità xierqa ta' ilma biex jintlahaq il-kontenut ta' umdiċa mehtieg, jiġifieri 40 sa 60 % tad-WHC massima (ara l-paragrafu 13). Kull soluzzjoni ta' sustanza kimika tat-test tithawwad sew b'lott wiehed ta' hamrija mxarrba minn qabel, qabel tiġi introdotta fir-reċipjent tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinhallx fl-ilma

20. Għal sustanzi kimiċi li ma jinhallux fl-ilma iżda li jinhallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinhall fl-iżgħar volum possibbli ta' veikolu xieraq (eż. aċetun). Għandhom jintużaw biss solventi volatili. Il-veikolu jiġi sprejat fuq jew jithallat b'ammont żgħir, pereżempju 2,5 g, ta' ramel kwarzuż irqiq. Il-veikolu huwa eliminat bl-evaporazzjoni taht għata tad-dhahen għal tal-inqas siegħa. Din it-tahlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' hamrija mxarrba minn qabel u tithallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex tinkiseb l-umdiċa mehtiega. It-tahlita finali tiġi introdotta fir-reċipjenti tat-test.
21. Għal sustanzi kimiċi li ma tantx jinhallu fl-ilma u solventi organiċi, l-ekwi-valent ta' 2,5 g ta' ramel kwarzuż mithun irqiq f'kull reċipjent tat-test jithallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test mixtieqa. Din it-tahlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' hamrija mxarrba minn qabel u tithallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut ta' umdiċa mehtieg. It-tahlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jiġi ppreparat ukoll kontroll xieraq.
22. Is-sustanzi kimiċi għandhom normalment jiġu ttestjati f'konċentrazzjonijiet oghla minn 1 000 mg/kg massa ta' hamrija. Madankollu jaf ikun mehtieg ittestjar f'konċentrazzjonijiet oghla skont l-oġettivi ta' test speċifiku.

EŻEKUZZJONI TAT-TESTIJET**Gruppi tal-ittestjar u kontrolli**

23. Għal kull konċentrazzjoni tat-test, jitqiegħed ammont ta' hamrija tat-test korrispondenti għal 20 g piż xott fir-reċipjenti tat-test (ara l-paragrafi 19-21). Jiġu ppreparati wkoll kontrolli, minghajr is-sustanza kimika tat-test. L-ikel jiżdied ma' kull reċipjent skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafu 29. Għaxar dud jiġu allokat b'mod każwali f'kull reċipjent tat-test. Id-dud jiġi ttrasferit b'attenzjoni f'kull reċipjent tat-test u jitqiegħed f'wiċċ il-hamrija permezz ta' pereżempju, pinzetti, gancijiet jew holoq tal-ġojjellier. In-numru ta' repliki għal konċentrazzjonijiet tat-test u għall-kontrolli jiddependi fuq id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafu 34). Ir-reċipjenti tat-test jitqiegħdu b'mod każwali fl-inkubatur tat-test u dawn il-pożizzjonijiet jiġu randomizzati mill-ġdid kull ġimgħa.
24. Jekk għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jintuża veikolu, għandha ssir serje ta' kontrolli waħda li fiha ramel kwarzuż isprejjet jew imhallat b'solvent minbarra s-serje tal-ittestjar. Il-konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv għandha tkun l-istess bhal dik użata fir-reċipjenti tat-test li fihom is-sustanza kimika tat-test. Għandha ssir serje ta' kontrolli li fiha ramel kwarzuż addizzjonali (2,5 g f'kull reċipjent) għal sustanzi kimiċi li jehtieġu li jingħataw skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafu 21.

▼ **M6****Kundizzjonijiet tat-test**

25. It-temperatura tat-test hija 20 ± 2 °C. Biex id-dud jiġi skorragġit milli johrog mill-hamrija, it-test isir f'cikli ta' dawl u dlam ikkontrollati (ideament 16-il siegħa dawl u 8 siegħa dlam) b'illuminazzjoni ta' bejn 400 u 800 lux fiż-żona tar-reċipjenti tat-test.
26. Sabiex tiġi ċċekkjata l-umdità tal-hamrija, ir-reċipjenti jintiżnu fil-bidu tat-test u minn hemm 'il quddiem darba f'gimgha. Iz-żieda ta' ammont xieraq ta' ilma dejonizzat tagħmel tajjeb għat-telf tal-piż. Ta' min jgħid li t-telf tal-ilma jista' jtnaqqas biż-żamma ta' umdità għolja tal-arja (> 80 %) fl-inkubatur tat-test.
27. Il-kontenut ta' umdità u l-pH għandhom jitkejlu fil-bidu u fi tmiem it-test tas-sejba tal-medda u t-test finali. Il-kejljet għandhom isiru f'kontroll u fil-kampjuni tal-hamrija tal-kontroll u ttrattati (il-koncentrazzjonijiet kollha) imhejjin u miżmuma fl-istess mod b'hall-kulturi tat-test iżda mingħajr dud. L-ikel għandu jidded ma' dawn il-kampjuni tal-hamrija fil-bidu tat-test biex jiffaċilita l-attività mikrobjali. L-ammont ta' ikel miżjud għandu jkun l-istess bhal dak miżjud mal-kulturi tat-test. Mhuwiex mehtieg li żżid iktar ikel ma' dawn ir-reċipjenti matul it-test.

Tagħlif

28. Jista' jintuza ikel li bih tkun tista' tgħhix popolazzjoni ta' enchytraeids. Hafur irrumblat, preferibbilment mgħoddi minn awtoklavi qabel l-użu biex tevita l-kontaminazzjoni b'mikrobi (tishin huwa xieraq ukoll), instab li huwa materjal ta' tagħlif xieraq.
29. L-ikel l-ewwel jiġi pprovdut billi jithalltu 50 mg hafur irrumblat tal-art mal-hamrija f'kull reċipjent qabel ma jiddaħhal id-dud. Għalhekk, l-ikel huwa fornit kull gimgha sal-21 Jum. It-tagħlif ma jsirx fit-28 Jum peress li l-adulti jkun tnehhew f'dan l-istadju u l-frieh tad-dud jehtiegu relattivament ftit ikel addizzjonali lil hinn dan il-punt. It-tagħlif matul it-test jinkludi 25 mg hafur irrumblat irqiq għal kull reċipjent mqiegħed b'attenzjoni fuq wiċċ il-hamrija biex b'hekk jiġi evitat li d-dud iwegġa'. Sabiex jtnaqqas it-tkabbir fungali, il-qxur tal-hafur għandhom jinżerghu fil-hamrija billi jiġu koperti b'ammonti żgħar ta' hamrija. Jekk l-ikel jibqa' ma jittikilx, il-proporzjon għandu jtnaqqas.

Disinn għat-test tas-sejba tal-medda

30. Meta jkun mehtieg, test tas-sejba tal-medda jitwettagħ pereżempju b'hames konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg (piż xott tal-hamrija). Replikati wieħed għal kull trattament u kontroll huwa suffiċjenti.
31. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda hija gimagħtejn. Fi tmiem it-test, tiġi vvalutata l-mortalità tad-dud. Dudu huwa rreġistrat b'hal mejjiet jekk ma jkollu ebda reazzjoni b'hal stimulu mekkaniku fil-parti anterjuri. Informazzjoni addizzjonali għall-mortalità jaf ukoll tkun utli biex tittiehed deċiżjoni dwar il-medda ta' konċentrazzjonijiet li għandha tintuza fit-test finali. Il-bidliet fl-imġiba tal-adulti (eż. l-inabbiltà biex titthaffer il-hamrija; ma jiċċa-qalqux u jserjhu mal-hajt tal-ħgieg tar-reċipjent tat-test) u l-morfologija (eż. l-preżenza ta' feriti miftuha) għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieh. Dan tal-aħħar jista' jiġi ddeterminat permezz tal-metodu ta' tilwin deskritt fl-Appendiċi 6.
32. L-LC₅₀ jista' jiġi ddeterminat bejn wieħed u iehor billi tiġi kkalkolata l-medja ġeometrika tad-dejta tal-mortalità. Fl-istabbilment tal-medda ta' konċentrazzjoni għat-test finali, wieħed jassumi li l-effetti huma inqas mil-LC₅₀ b'fattur sa 10 darbiet. Madankollu, din hija relazzjoni empirika u fi

▼ **M6**

kwalunkwe każ speċifiku jaf tkun differenti. Osservazzjonijiet addizzjonali li saru fit-test tas-sejba tal-medda bhall-okkorrenza tal-frieh jistgħu jgħinu biex jirfinaw il-medda tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha tintuża għat-test finali.

33. Sabiex ikun hemm determinazzjoni preċiża tal- LC_{50} , huwa rakkomandat li t-test jitwettagħ b'tal-anqas erba' repliki tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u numru adegwat tal-konċentrazzjonijiet biex jiġu kkawżati tal-inqas erba' risponsi medji differenti statistikament sinifikanti f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Numru simili ta' konċentrazzjonijiet u repliki għall-kontrolli jintużaw meta jkunu applikabbli.

Disinn għat-test tar-riproduzzjoni finali

34. Huma proposti tliet disinji abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test (2)

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas hames konċentrazzjonijiet f'serje geometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbix 1,8.

— Għad-determinazzjoni tal- EC_x (eż. EC_{10} , EC_{50}), għandhom jiġu ttestjati hames konċentrazzjonijiet u l-konċentrazzjonijiet għandhom jibbrakitjaw f' EC_x sabiex jippermettu l-interpolazzjoni ta' EC_x u mhux estrapolazzjoni. Tal-inqas erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test u erba' repliki ta' kontroll huma rakkomandati. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugħali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal- EC_x . Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje geometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbix il-1,8.

35. Għandhom jintużaw għaxar dud adulti għal kull reċipjent tat-test (ara l-paragrafu 23). L-ikel jizdied mar-reċipjenti fil-bidu tat-test u mbagħad darba f'gimgha (ara paragrafu 29) sal-21 Jum. Fil-21 Jum, il-kampjuni tal-ħamrija ssirihom tfittixija bir-reqqa bl-idejn u d-dud adulti ħajjin jiġu osservati u jingħaddu u jiġu rreġistrati l-bidliet fl-imġiba (eż. inabbiltà li titħaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjhu mal-ħajt tal-ħgieg tar-reċipjent tat-test) u fil-morfoloġija (eż. feriti miftuħa). Id-dud adult mbagħad jitneħħa mir-reċipjenti tat-test u l-ħamrija tat-test. Il-ħamrija tal-ittestjar li fiha kwalunkwe fosdqa li kienu prodotti huma inkubati għal tliet gimghat addizzjonali taħt l-istess kundizzjonijiet tat-test hliet dik li t-tagħlif isehh biss fil-Jum 35 (jiġifieri 25 mg ħafur tal-art irrumblat għal kull reċipjent).

36. Wara sitt gimghat, jingħadd id-dud li għadu kif faqqas. Il-metodu bbażat fuq tbajja ħomor ta' Bengal (ara l-Appendiċi 6) huwa rakkomandat għalkemm estrazzjoni mxarrba oħra (izda mhux bis-shana) u metodi ta' żamma fil-wiċċ (ara l-Appendiċi 6) ipprovaw ukoll li huma xierqa (4)(10)(11)(20). Tbajja ħomor ta' Bengal huma rakkomandati peress li l-estrazzjoni mxarrba minn sottostrat tal-ħamrija tista' titfixxkel minn turbidità kkawżata minn frak tat-tafal suspizi.

Test tal-limitu

37. Jekk ma jkunu osservati ebda effetti fuq l-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jista' jitwettagħ bħala test tal-limitu, permezz ta' 1 000 mg/kg sabiex jintwera li l-NOEC għar-riproduzzjoni huwa ikbar minn dan il-valur.

▼ M6

Sommarju u skeda taż-żmien għat-test

38. Il-passi tat-test jistgħu jingabru fil-qosor kif ġej:

Hin	Test tas-sejba tal-medda	Test finali
Jum -7 jew iktar kmieni	— Hejji l-ħamrija artifiċjali (tahlita ta' kostitwenti xotti)	— Hejji l-ħamrija artifiċjali (tahlita ta' kostitwenti xotti)
Jum -5	— Iċċekkja l-pH tal-ħamrija artifiċjali — Kejjel id-WHC massima tal-ħamrija	— Iċċekkja l-pH tal-ħamrija artifiċjali — Kejjel id-WHC massima tal-ħamrija
Jum -5 sa -3	— Issepara d-dud għall-akklimatizzazzjoni	— Issepara d-dud għall-akklimatizzazzjoni
Jum -3 sa 0	— Akklimatizza d-dud għal tal-inqas 24 siegħa	— Akklimatizza d-dud għal tal-inqas 24 siegħa
Jum -1	— Xarrab bl-ilma l-ħamrija artifiċjali minn qabel u qassamha f'lottijiet	— Xarrab bl-ilma l-ħamrija artifiċjali minn qabel u qassamha f'lottijiet
Jum 0	— Hejji s-soluzzjonijiet ewlenin — Applika s-sustanza kimika tat-test — Iżen is-sottostrat tat-test fir-reċipjenti tat-test — Hallat fl-ikel — Dahħal id-dud — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità	— Hejji s-soluzzjonijiet ewlenin — Applika s-sustanza kimika tat-test — Iżen sottostrat tal-ittestjar fir-reċipjenti tat-test — Hallat fl-ikel — Dahħal id-dud — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità
Jum 7	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Aghlef
Jum 14	— Iddetermina l-mortalità tal-adulti — Numru stmat ta' frieh — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità	— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Aghlef
Jum 21		— Osserva l-imġiba tal-adulti — Nehhi l-adulti — Iddetermina l-mortalità tal-adulti — Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Aghlef
Jum 28		— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Taghlifx
Jum 35		— Iċċekkja l-kontenut ta' umdità fil-ħamrija — Aghlef
Jum 42		— Ghodd id-dud frieh — Kejjel il-pH tal-ħamrija u l-kontenut ta' umdità

▼ **M6****DEJTA U RAPPORTAR****Trattament tar-riżultati**

39. Ghalkemm tinghata harsa ġenerali fl-Appendiċi 7, ma tinghata ebda gwida statistika definittiva għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar.
40. Fit-test tas-sejba tal-medda, il-punt ta' tmiem ewlieni huwa l-mortalità. Il-bidliet fl-imġiba (eż. l-inabbiltà biex titthaffer il-hamrija; ma jiċċaqalqux u jserjhu mal-hajt tal-ġieġ tar-riċipjent tat-test) u l-morfologija (eż. l-preżenza ta' feriti miftuħa) tad-dud adult għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieh. L-analiżi probit (21) jew ir-riġressjoni loġistika għandhom normalment jiġu applikati biex tiġi ddeterminata l- LC_{50} . Madankollu, f'każijiet fejn dan il-metodu ta' analiżi mhuwiex xieraq (eż. jekk inqas minn tliet konċentrazzjonijiet bi qtil parzjali huma disponibbli), jistgħu jintużaw metodi alternattivi. Dawn il-metodi jistgħu jinkludu ċ-ċaqliq tal-medji (22), il-metodu Spearman-Kärber trimmjat (23) jew interpolazzjoni sempliċi (eż. medja ġeometrika ta' LC_0 u LC_{100} , kif ikkalkolat mill-għerq kwadrat ta' LC_0 immultiplikat b' LC_{100}).
41. Fit-test finali, il-punt ta' tmiem tat-test huwa l-fekondità (jiġifieri numru ta' frieh prodotti). Madankollu, bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' dannu l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll. L-analiżi statistika titlob l-medja aritmetika u d-devjazzjoni standard għal kull trattament u għal kull kontroll għar-riproduzzjoni biex tkun ikkalkolata.
42. Jekk titwettaq analiżi tal-varjanza, id-devjazzjoni standard, s, u l-grad ta' libertà, df, jistgħu jiġu sostitwiti mill-istima tal-varjanza raggrupjata mill-ANOVA u l-grad ta' libertà, rispettivament — sakemm il-varjanza ma tiddependi fuq il-konċentrazzjoni. F'dan il-każ, uża l-varjanzi uniċi tal-kontroll u t-trattamenti. Dawn il-valuri huma ġeneralment ikkalkolati minn softwer statistiku kummerċjali permezz ta' riżultati għal kull riċipjent bħala repliki. Jekk ir-raggruppar tad-dejta għall-kontrolli negattivi u tas-solventi jidher raġonevoli iktar mill-ittestjar ma' wiehed minn dawk, dawn għandhom jiġu ttestjati biex jiġi osservat li mhumiex sinifikament differenti (għal testijiet xierqa ara l-paragrafu 45 u l-Appendiċi 7).
43. Testjar u inferenza statistika ulterjuri tiddependi fuq jekk il-valuri tar-repliki humiex normalment distribwiti u humiex omoġenji fir-rigward tal-varjanza tagħhom.

Stima tal-NOEC

44. L-applikazzjoni ta' testijiet qawwija għandha tiġi ppreferuta. Wiehed għandu juża informazzjoni eż. minn esperjenza preċedenti b'ring testing jew dejta storika oħra dwar jekk id-dejta storika hijiex distribwita b'mod approssimattiv normali. L-omoġeneità tal-varjanza (omoscedasticità) hija iktar kritika. L-esperjenza tgħid li l-varjanza hafna drabi tiżdied meta tiżdied il-medja. F'dawn il-każijiet, trasformazzjoni tad-dejta tista' twassal għal homoscedasticità. Madankollu, tali trasformazzjoni għandha tkun ibbażata fuq esperjenza b'dejta storika iktar milli dejta li tkun qiegħda tiġi investigata. B'dejta omoġenja, għandhom jitwettqu testijiet-t multipli bħat-test ta' Williams ($\alpha = 0,05$, naha wahda) (24)(25) jew f'ċerti każijiet, it-test ta' Dunnett (26)(27). Għandu jiġi nnotat li, fil-każ ta' replikazzjoni mhux indaqs, il-valuri-t tat-tabella għandhom jiġu korretti kif issuggerit minn Dunnett u Williams. Xi drabi, minhabba varjazzjoni kbira, ir-risponsi ma jiżdidux/jonqsux b'mod regolari. F'dan il-każ ta' devjazzjoni qawwija mill-monotonicità, it-test ta' Dunnett huwa iktar xieraq. Jekk hemm iktar devjazzjonijiet mill-omoscedasticità, jaf ikun raġonevoli li jiġu investigati l-effetti possibbli fuq il-varjanzi

▼ **M6**

iktar mill-qrib biex jiġi deċiż jekk it-testijiet-t jistgħu jiġu applikati mingħajr it-telf ta' hafna qawwa (28). Inkella, test-U multiplu, eż. t-test-U ta' Bonferroni skont Holm, (29), jew meta din id-dejta tessebixxi omossedastività iżda hija altrimenti konsistenti mar-rispons għad-doża ta' monoton sottostanti, jista' jiġi applikat test mhux parametrik iehor [eż. Jonckheere-Terpstra (30) (31) jew Shirley (32) (33)] u ġeneralment ikun ippreferut minn testijiet-t tal-varjanza mhux indaq. (ara wkoll l-iskema fl-Appendiċi 7).

45. Jekk ikun twettaq test tal-limitu u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri parametriċi tal-ittejtjar (normalità, omoġenità), jista' jintuża t-test-t tal-Istudent parallel jew inkella l-proċedura ta' test-U ta' Mann-Whitney (29).

Estimi ta' EC_x

46. Biex jiġi kkalkolat kwalunkwe valur EC_x , jintużaw il-medji għal kull trattament għall-analiżi tar-rigressjoni (lineari jew mhux lineari), wara li tkun inkisbet funzjoni ta' rispons/doża xierqa. Għat- EC_x jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni kontinwu, il-valuri EC_x - jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (35). Fost il-funzjonijiet xierqa għal dejta kwantali (mortalità/sopravivenza) u numru ta' wlied prodotti, huma l-funzjonijiet sigmoid, logistiċi jew Weibull, li fihom tnejn sa erba' parametri, li xi whud minnhom jistgħu jimmudellaw ukoll ir-risponsi ormetriċi. Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża ddahhlet b'analizi tar-rigressjoni lineari, għandha tinstab r^2 sinifikanti (koeffiċjent ta' determinazzjoni) u/jew gradjent bl-analiżi tar-rigressjoni qabel l-istima tal- EC_x billi jiddahhal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba b'analizi tar-rigressjoni. limiti ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati skont il-metodu ta' Fieller (iċċitat f'Finney (21)) jew metodi xierqa moderni ohra.
47. Inkella, ir-rispons jiġi mmudellat b'haġġ percentwali jew proporzjon tal-parametru ta' mudell li huwa interpretat b'haġġ r-rispons medju ta' kontroll. F'dawn il-kazijiet, il-kurva sigmoid (logistika, Weibull) hafna drabi tista' tiddahhal fir-risultati permezz ta' proċedura ta' rigressjoni probit (21). F'dawn il-kazijiet, il-funzjoni ta' ppeżar għandha tiġi aġġustata għal risponsi metriċi kif mogħti minn Christensen (36). Madankollu, jekk tkun osservata ormezi, l-analiżi probit għandha tiġi sostitwita minn funzjoni logistika jew Weibull b'erba' parametri, imdahhla minn proċedura ta' rigressjoni mhux lineari (36). Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża xierqa ma tistax tiddahhal mad-dejta, wiehed jista' juża metodi alternattivi biex tiġi stmata l- EC_x , u l-limiti tal-kunfidenza tagħha, b'haġġ-Moving Averages wara l-proċedura Thompson (22) u l-proċedura Spearman-Kärber Trimmjata (23).

RAPPORT TAT-TEST

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

Sustanza kimika tat-test:

- in-natura fizika u, fejn ikunu rilevanti, il-proprietajiet fizikokimiċi (eż. solubbiltà fl-ilma, pressjoni tal-fwar);
- l-identifikazzjoni kimika tas-sustanza kimika tat-test skont in-nomenklatura ta' IUPAC, in-numru CAS, il-grupp, il-lott, il-formula strutturali u l-purità;
- id-data ta' skadenza tal-kampjun.

Speċijiet tat-test:

- l-annimali tat-test użati: l-ispeċi, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organizmi u l-kundizzjonijiet ta' tghammir.

Kundizzjonijiet tat-test:

- l-ingredjenti u l-preparazzjoni tal-hamrija artifiċjali;

▼ **M6**

- il-metodu ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test;
- id-deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tat-test, inkluż it-temperatura, il-kontenut ta' umdità, il-pH, eċċ;
- deskrizzjoni shiħa tad-disinn u l-proċedura sperimentali.

Riżultati tat-test:

- il-mortalità tad-dud adult wara ġimagħtejn u n-numru ta' frieħ fi tmiem tat-test tas-sejba tal-medda;
- il-mortalità tad-dud adult wara espożizzjoni ta' tliet ġimghat u r-rekord shiħ tal-frieħ fi tmiem it-test finali;
- kwalunkwe sintomu fiżiku jew patoloġiku osservat u l-bidliet fl-imġiba fl-organizmi tat-test;
- l-LC₅₀, l-NOEC u/jew l-EC_x (eż. EC₅₀, EC₁₀) għar-riproduzzjoni jekk xi whud minnhom ikunu applikabbli b'intervalli ta' kunfidenza, u graff tal-mudell imdahħal għall-kalkolu tiegħu, l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati;

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.
- (3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (5) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Tossicità għall-Hniex.
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.
- (7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- (8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.
- (11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼ **M6**

- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römcke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carben-dazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchy-traeidae 4, 79-96.
- (15) Römcke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorga-nismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revi-sion and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. *Ann. Limnol.* 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.

▼ M6

- (33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, huma applikabbli d-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

EC_x (konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organizmi tat-test fil-perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. F'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet tal-effett huma espressi bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tat-test.

LC₀ (L-ebda konċentrazzjoni letali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li ma toqtolx xi wieħed mill-organizmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC₀ hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC₅₀ (Konċentrazzjoni letali medja) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 50 % tal-organizmi tat-test esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC₅₀ hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LC₁₀₀ (Konċentrazzjoni letali totali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 100 % tal-organizmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC₁₀₀ hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar.

LOEC (Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$). F'dan it-test, l-LOEC hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-ħamrija tal-ittestjar. Il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandhom normalment juru effett li huwa statistikament differenti mill-kontroll. Kwalunkwe devjazzjoni minn dawn ta' fuq fl-identifikazzjoni tal-LOEC għandha tiġi ġġustifikata fir-rapport tat-test.

NOEC (Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test eżattament taħt l-LOEC fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Rata ta' riproduzzjoni hija n-numru medju ta' dud frieħ prodott għal kull numru ta' adulti matul il-perjodu tal-ittestjar.

Sustanza kimika tal-ittestjar hija sustanza jew tahlita ttestjata matul dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ **M6***Appendiċi 2***Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima tal-ilma****Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima ta' ilma tal-hamrija arti-fiċjali**

Il-metodu li ġej instab li huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2.

Igħbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-hamrija tat-test permezz ta' apparat xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru u, wara li timlieh bl-ilma u, qiegħdu fuq xtelliera f'banjumarija. It-tubu għandu jiddahhal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-hamrija. Imbagħad għandu jithalla fl-ilma għal madwar tliet sghat. Peress li ma jistax jinżamm l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-hamrija, il-kampjun tal-hamrija għandu jithalla jtbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ramel kwarz uż mithun irqiq imxarrab hafna li huwa inkluż f'reċipjent magħluq (biex jiġi evitat li jinxf). Il-kampjun għandu mbagħad jintizen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f' \% ta' massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

REFERENZI:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼ M6*Appendiċi 3***Determinazzjoni tal-pH tal-hamrija**

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH ta' kampjun tal-hamrija, huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO 10390 (Kwalità tal-Hamrija — Determinazzjoni tal-pH).

Kwantità ddefinita tal-hamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-hamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' hamrija) f'hames darbiet il-volum tagħha ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku (CaCl_2). Is-sospensjoni mbagħad tithallat sew għal hames minuti. Wara li tithawwad, is-sospensjoni tithalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Il-pH tal-fażi likwida mbagħad jitkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

REFERENZI:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼ M6

Appendiċi 4

Kundizzjonijiet ta' kulturi ta' *Enchytraeus* sp.

L-enchytraeids tal-ispeċi *Enchytraeus albidus* (kif ukoll speċijiet *Enchytraeus* ohra) jistghu jiġu kkulturati f'kaxx tal-plastik kbar (eż. $30 \times 60 \times 10$ cm) mimlija b'tahlita 1:1 ta' hamrija artifiċjali u hamrija tal-gnien, naturali mhux ikkontaminata. Materjal kompost għandu jiġi evitat peress li jaf ikun fih sustanzi kimiċi tossiċi bħal metalli tqal. Il-fawna għandha titneħħa mill-hamrija qabel l-użu (eż. permezz ta' ffrizjar qawwi). Jista' jintuża wkoll sottostrat li jinkludi biss hamrija artifiċjali, iżda r-rata ta' riproduzzjoni tista' tkun inqas minn dik miksuba b'sottostrat ta' hamrija mhallta. Is-sottostrat użat għall-kulturi għandu jkollu pH ta' $6,0 \pm 0,5$.

Il-kutura tinzamm fid-dlam f'temperatura ta' 15 sa 20 °C ± 2 °C. Temperaturi oghla minn 23 °C għandhom jiġu evitati. Il-hamrija għandha tinzamm umda iżda mhux imxarra. Il-kontenut it-tajjeb ta' umdità fil-hamrija huwa indikat meta jidhru qtar żgħir ta' ilma bejn is-swaba' meta l-hamrija tingħafas gentilmente. Il-produzzjoni ta' kundizzjonijiet anossiċi għandha tiġi evitata billi jiġi żgurat li l-għotjien tal-kontenituri tal-kulturi jippermettu skambju gassuż xieraq mal-atmosfera. Il-hamrija għandha tinqassam kull ġimgħa biex tiġi ffaċilitata l-arjazzjoni.

Id-dud jista' jintema b'hafur irrumblat. Il-hafur għandu jinħażen f'reċipjenti ssiġillati u awtoklavat jew imsahhan qabel l-użu sabiex tiġi evitata infestazzjoni b'dud tad-dqiq (eż. *Glycyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) jew b'dud predatur [eż. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Wara trattament bl-ishana, l-ikel għandu jintahan biex b'hekk ikun jista' jinxtered faċilment fuq wiċċ il-hamrija. Minn żmien għall-iehor, il-hafur irrumblat jista' jiġi ssupplimentat b'żieda ta' vitamini, halib u żejt tal-fwied tal-merluzz. Sorsi ta' ikel xierqa ohra huma l-hmira tal-furnar u l-ikel tal-ħut "Tetramin".

It-tagħlif isir bejn wiehied u iehor darbtejn fil-ġimgħa. Kwantità xierqa ta' hafur irrumblat jinxtered fuq wiċċ il-hamrija jew jithallat b'attenzjoni fis-sottostrat meta tinqasam il-hamrija biex tiġi ffaċilitata l-arjazzjoni. L-ammont assolut ta' ikel ipprovdut jiddependi fuq in-numru ta' dud preżenti fis-sottostrat. Bħala gwida, l-ammont ta' ikel għandu jizdied jekk jiġi kkunsmat kollu fi żmien jum minn meta jiġi pprovdut. Bil-maqlub, jekk l-ikel xorta jibqa' fuq il-wiċċ fiż-żmien tat-tieni tagħlif (ġimgħa wara) dan għandu jitnaqqas. L-ikel ikkontaminat bit-tkabbir fungali għandu jitneħħa u jiġi ssostitwit. Wara tliet xhur, id-dud għandu jiġi ttrasferit f'sottostrat li għadu kif jiġi ppreparat.

Il-kundizzjonijiet tal-kulturi jitqiesu sodisfaċenti jekk id-dud: (a) ma jippruvawx jitolqu mis-sottostrat tal-hamrija, (b) jiċċaqalqu rapidament fil-hamrija, (c) jesibixxu qoxra tleqq mingħajr frak tal-hamrija aderenti, (d) bejn wiehied u iehor għandhom kulur abjad, (e) jesibixxu varjetà ta' meded ta' etajiet fil-kulturi u (f) jirriproduċu b'kontinwità.

▼ M6

Appendiċi 5

Twettiq tat-test bi speċijiet *Enchytraeus* ohra

Għażla ta' speċijiet

Jistgħu jintużaw speċijiet oħrajn minbarra *E. albidus* izda l-proċedura tal-ittestjar u l-kriterji tal-validità għandhom jiġu adattati skont dan. Peress li hafna speċijiet *Enchytraeus* huma disponibbli minnufih u jistgħu jinżammu b'mod sodisfaċenti fil-laboratorju, il-kriterju l-iktar importanti għall-għażla ta' speċi differenti minn *E. albidus* hija r-rilevanza ekoloġika, kif ukoll is-sensittività paragonabbli. Jista' jkun hemm ukoll raġunijiet formali għal skambju ta' speċi. Pereżempju, f'pajjiżi fejn ma tinstabx *E. albidus* u ma tistax tiġi importata (eż. minhabba restrizzjonijiet ta' kwarantina), sejjer ikun mehtieg li tintuza speċi *Enchytraeus* ohra.

Eżempji ta' speċijiet alternattivi xierqa

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): F'dawn l-aħħar snin, din l-ispeċi hafna drabi ntuzat f'studji ekotossikoloġiċi minhabba s-sempliċità tat-tgħammir u l-ittestjar tagħha. Madankollu, hija żgħira u dan jagħmel l-immaġniġġar iktar diffiċli meta mqabbel ma' *E. albidus* (speċjalment fl-istadji qabel l-użu tal-metodu ta' tilwin). *E. crypticus* ma hariġx li teżisti b'certezza fis-sit, peress li għet deskritta biss minn kulturi ta' hniex. Għalhekk, ir-rekwiziti ekoloġiċi tagħha mhumix magħrufa.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Dan l-isem probabbilment li jkopri grupp ta' speċijiet relatati mill-qrib li huma morfologikament diffiċli biex jintgħarfu. L-użu tiegħu għall-ittestjar mhuwiex rakkomandat sakemm l-individwi użati f'test jistgħu jiġu identifikati mal-ispeċi. *E. buchholzi* ġeneralment tinstab f'merġat u f'siti disturbati bħala ġniebi tat-toroq.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Din l-ispeċi kienet oriġinarjament magħrufa bħala *E. "minutus"*, izda għet deskritta dan l-aħħar (1). Instabet l-ewwel minn U. Graefe (Hamburg) f'merġha qrib St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, il-Ġermanja). *E. luxuriosus* hija madwar nofs id-daqs ta' *E. albidus* izda ikbar mill-ispeċijiet l-oħra diskussi hawnhekk; dan jista' jagħmila alternattiva tajba għal *E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Din l-ispeċi s'issa kienet irrapportata minn hamriji minerali Ġermaniżi u Spanjoli, fejn hija komuni izda ġeneralment mhux abbundanti hafna. Meta mqabbla ma' speċijiet żgħar ohra ta' dan il-ġeneru, hija relattivament faċli biex tiġi identifikata. Xejn mhu magħruf dwar l-imġiba tagħha fit-testijiet tal-laboratorju jew is-sensittività tagħha għas-sustanzi kimiċi. Madankollu, instab li hija faċli biex tiġi kkulturata (*E. Belotti*, komunikazzjoni personali).

Kundizzjonijiet tat-tgħammir

L-ispeċijiet ta' *Enchytraeus* kollha msemija hawn fuq jistgħu jiġu kkulturati fl-istess sottostrati użati għal *E. albidus*. Id-daqs żgħir tagħhom ifisser li r-riċipjenti tal-kultura jistgħu jkunu iżgħar u li, filwaqt li jista' jintuza l-istess ikel, id-daqs tal-proporzjon għandu jiġi aġġustat. Iċ-ċiklu tal-hajja ta' dawn l-ispeċijiet huwa iqsar milli għal *E. albidus* u t-tagħlif għandu jsir b'mod iktar frekwenti.

Kundizzjonijiet tat-test

Il-kundizzjonijiet tat-test huma ġeneralment l-istess bħal dawk li japplikaw għal *E. albidus*, hlief li:

- id-daqs tar-riċipjenti tat-test jista' (izda ma għandux bżonn) ikun iżgħar; id-durata tat-test tar-riproduzzjoni jista' (izda ma għandux bżonn) ikun iqsar, jiġifieri erba' gimghat minflok sitta;
- madankollu, id-durata tat-Test tas-Sejba tal-Medda ma għandhiex titbidel;
- fid-dawl tad-daqs żgħir tad-dud frieh, l-użu ta' metodu ta' titbigh huwa rakkomandat b'mod qawwi għall-ghadd;
- il-kriterju ta' validità relatat man-“numru ta' frieh għal kull riċipjenti tat-test fil-kontroll” għandu jitbidel għal “50”.

▼ **M6**

REFERENZI

- (1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolina* 57, 93-100.

▼ **M6***Appendiċi 6***Deskrizzjoni ddettaljata tat-tekniki ta' estrazzjoni****Titbigh b'ahmar ta' Bengal**

Dan il-metodu, li oriġinarjament gie żviluppat f'ekologija limnika (1) kien propost l-ewwel darba għall-ghadd ta' enchytraeids frieh fit-test tar-riproduzzjoni ta' Enchytraeidae minn W. de Coen (Università ta' Ghent, il-Belġju). Indipendentement, verżjoni mmodifikata (Bengalred imhallat b'formaldeid minflok etanol) kienet żviluppata minn RIVM Bilthoven (2)(3).

Fi tmiem it-test finali (jigifieri wara sitt ġimghat), il-hamrija fir-riċipjent tat-test tiġi ttrasferita għal kontenitur baxx. Riċipjent Bellaplast jew photo basin b'qiegħ imqabbez huwa utli għal dan il-fini, dan tal-aħhar peress li l-“kustilji” jillimitaw il-moviment tad-dud fil-qasam ta' osservazzjoni. Il-frieh huma fissi mal-etanol (madwar 5 ml għal kull replikat). Imbagħad ir-riċipjenti jimtlew bl-ilma sa strat ta' 1 sa 2 cm. Jiżdiedu ftit qtar (200 sa 300 µl) ta' Bengal red (1 % soluzzjoni fl-etanol) (0,5 % eosin hija alternattiva) u ż-żewġ komponenti jithalltu b'attenzjoni. Wara 12-il siegħa, id-dud għandu jittiebba' b'kulur hamrani u għandu jkun faċli biex jingħadd peress li sejjer jitqiegħed fuq wiċċ is-sottostrat. Inkella, it-tahlita tas-sottostrat/alkohol tista' tinhasel permezz ta' passatur (daqs tax-xibka: 0,250 mm) qabel ma jingħadd id-dud. Permezz ta' din il-proċedura, il-kaolinit, il-pit, u xi parti mir-ramel sejjer jinhasel u wiehed sejjer ikun jista' jara u jghodd id-dud b'kulur hamrani. L-użu ta' lentijiet illuminati (daqs tal-lenti tal-inqas 100 × 75 mm b'fattur ta' ingrandiment ta' 2 sa 3x) sejjer jiffacilita wkoll l-ghadd.

It-teknika ta' titbigh tnaqqas il-hin ta' għadd għal ftit minuti f'kull riċipjent u bhala gwida għandu jkun possibbli għal kull persuna li tivvaluta r-riċipjenti kollha minn test wiehed f'massimu ta' jumejn.

Estrazzjoni mxarrba

L-estrazzjoni mxarrba għandha tinbeda mill-ewwel malli jintemm it-test. Il-hamrija minn kull riċipjent tat-test titqiegħed f'passaturi tal-plastik b'daqs tax-xibka ta' madwar 1 mm. Il-passaturi mbagħad jiġu sospiżi fi skutelli tal-plastik mingħajr ma jintmess il-qiegħ. L-iskutelli jimtlew b'attenzjoni bl-ilma sakemm il-kampjuni fil-passaturi jkunu kompletament taht wiċċ l-ilma. Biex tiġi assicurata rata ta' rkupru ta' iktar minn 90 % tad-dud preżenti, għandu jintuża perjodu ta' estrazzjoni ta' 3 ijiem f'20 ± 2 °C. Fi tmiem il-perjodu ta' estrazzjoni, il-passaturi jitnehhew u l-ilma (hlief għal ammont żgħir) jitferra' bil-mod, b'attenzjoni biex ma jiġix iddisturbat in-naqal f'qiegħ l-iskutelli. L-iskutelli tal-plastik imbagħad jithalltu ftit biex in-naqal jiġi sospiż fl-ilma tal-madwar. L-ilma huwa ttrasferit f'dixx petri wara li l-frak tal-hamrija jkun qagħad, l-enchytraeids jistghu jiġu identifikanti, jitnehhew u jingħaddu permezz ta' sterjomikroskopju u pinzetti tal-azzar roto.

Żamma fil-wiċċ

Metodu bbażat fuq iż-żamma fil-wiċċ gie deskritt f'nota minn R. Kuperman (4). Wara li jiġu stabbiliti l-kontenut tar-riċipjenti tat-test b'etanol, il-hamrija titfawwar b'Ludox (AM-30 silika kollojdali, 30 wt. % sospensjoni fl-ilma) bejn 10 sa 15-il mm 'il fuq minn wiċċ il-hamrija. Wara li l-hamrija tithallat sew mal-aġent ta' flotazzjoni għal 2 — 3 minuti, id-dud frieh li jkun jinsab fil-wiċċ jista' jingħadd faċilment.

REFERENZI

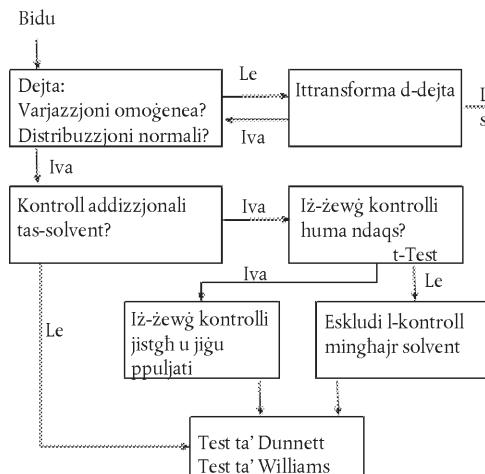
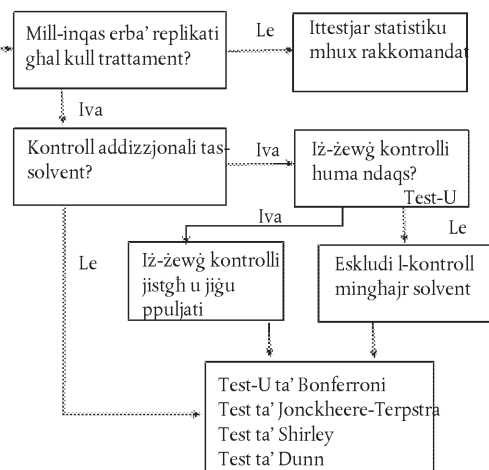
- (1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Československo Společnosti Zoologické 32, 300-305.

▼ M6

- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta, Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* **38**, 108-121.
- (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼ **M6**

Appendiċi 7

Harsa ġenerali lejn il-valutazzjoni statistika tad-dejta (determinazzjoni tal-NOEC)**Testijiet parametriċi****Testijiet non-parametriċi**

▼ M6

C.33. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-HNIEX (*EISENIA FETIDA*/
EISENIA ANDREI)

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 222 tal-OECD (2004). Huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-produzzjoni riproduttiva (u punti ta' tmiem letali ohra) tal-ispeċijiet ta' hniex *Eisenia fetida* (Savigny 1826) jew *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). It-test sarlu ring test (3). Jeżisti metodu ta' ttestjar għat-tossiċità akuta tal-hniex (4). Ġew ippubblikati numru ta' linji gwida internazzjonali u nazzjonali ohra għal testijiet akuti u kroniċi tal-hniex (5)(6)(7)(8).
2. *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei* huma kkunsidrati bħala wieħed mir-rappreżentanti tal-fawna tal-hamrija u l-hniex b'mod partikolari. Hija disponibbli informazzjoni ta' sfond dwar l-ekoloġija tal-hniex u l-użu tagħhom fl-ittestjar ekotossikoloġiku (7)(9)(10)(11)(12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Id-dud adult huwa espost għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imhallata mill-hamrija jew, fil-każ ta' pestiċidi, applikati fil-hamrija jew go fiha permezz ta' proċeduri konsistenti mal-mudell ta' użu tas-sustanza kimika. Il-metodu ta' applikazzjoni huwa speċifiku għall-fini tat-test. Il-medda ta' konċentrazzjonijiet tat-test huwa magħżul biex jinkludi dawk li x'aktarx jikkawżaw effett sottoletali jew letali f'perjodu ta' tmien ġimgħat. Il-mortalità u l-effetti ta' tkabbir fuq id-dud adult huma ddeterminati wara 4 ġimgħat ta' espożizzjoni. L-adulti mbagħad jitnehhew mill-hamrija u l-effetti fuq ir-riproduzzjoni vvalutati wara 4 ġimgħat ohra billi jingħadd in-numru ta' wlied preżenti fil-hamrija. Il-produzzjoni riproduttiva tad-dud hija espota għas-sustanza kimika tat-test meta mqabbel ma' dik tal-kontroll(i) sabiex tiġi ddeterminata (i) il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) u/jew (ii) EC_x (eż. EC_{10} , EC_{50}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża tnaqqis ta' x % fil-produzzjoni riproduttiva. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakittaw l- EC_x (eż. EC_{10} , EC_{50}) biex b'hekk l- EC_x imbagħad tiġi mill-interpolazzjoni iktar milli l-estrapolazzjoni (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. L-informazzjoni li ġejja relatata mas-sustanza kimika tat-test għandha tkun disponibbli biex tassisti fid-disinn ta' proċeduri tat-test xierqa:
 - is-solubbiltà fl-ilma;
 - $\log K_{ow}$;
 - il-pressjoni tal-fwar;
 - u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba fl-ambjent, fejn ikun possibbli (eż. ir-rata ta' fotolizi u r-rata ta' idrolizi fejn ikun rilevanti għal xejriet ta' applikazzjoni).
5. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi kollha, irrispettivament mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, iddefiniti hawnhekk bħala sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-partizzjoni tal-arja/ilma huwa iktar minn wieħed, jew għas-sustanzi kimiċi bi pressjonijiet tal-fwar li jaqsbu 0,0133 Pa f'25 °C.
6. Ma ssir ebda konċessjoni f'dan il-metodu ta' ttestjar għal degradazzjoni possibbli tas-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tat-test. Għaldaqstant, wieħed ma jistax jassumi li l-konċentrazzjonijiet tal-espożizzjoni se jrinjanzammu fil-valuri inizjali matul it-test kollu. Hija rakkomandata analiżi kimika tas-sustanza kimika tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test f'dak il-każ.

▼ **M6****SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA**

7. L-NOEC u/jew l-EC_x ta' sustanza kimika ta' referenza għandhom jiġu ddeterminati biex jipprovdu assigurazzjoni li l-kundizzjonijiet tat-test tal-laboratorju huma adegwati u biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organizmi tal-ittestjar ma jinbidilx statistikament maż-żmien. Huwa rakkomandabbli li sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata tal-inqas darba f'sena jew, meta jitwettagħ ittestjar bi frekwenza iktar baxxa, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossicità ta' sustanza kimika tat-test. Karbendażim jew benomil huma sustanzi kimiċi ta' referenza xierqa li ntwerew li jaffettwaw ir-riproduzzjoni (3). Għandhom jiġu osservati effetti sinifikanti bejn (a) 1 u 5 mg ta' massa xotta tas-sustanza attiva (a.i.)/kg jew (b) 250-500 g/ha jew 25-50 mg/m². Jekk standard tat-tossicità pożittiv huwa inkluż fis-serje tat-test, tintuża konċentrazzjoni waħda u n-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak fil-kontrolli.

VALIDITÀ TAT-TEST

8. Il-kriterji li ġejjin għandhom jiġu stratifikati fil-kontrolli għal riżultat tat-test biex jitqies validu:

- kull replikat (li fih 10 adulti) li jkun iproduċa ≥ 30 ferħ sa tmien it-test;
- il-koeffiċjent ta' varjazzjoni tar-riproduzzjoni li għandu jkun ta' ≤ 30 %;
- il-mortalità tal-adulti matul l-4 ġimgħat inizjali tat-test li għandha tkun ta' ≤ 10 %.

Fejn test jonqos milli jissodisfa l-kriterji ta' validità ta' hawn fuq, it-test għandu jiġi tterminat sakemm ma tkunx tista' tiġi pprovduta ġustifikazzjoni biex isir it-test. Il-ġustifikazzjoni għandha tiġi inkluża fir-rapport.

DESKRIZZJONI TAT-TEST**Tagħmir**

9. Għandhom jintużaw żewġ kontenituri tal-ittestjar li huma magħmula mill-ħġieġ jew materjal kimikament inerti iehor ta' kapaċità ta' litru sa żewġ litri. Il-kontenituri għandu jkollhom erja transsettorjali ta' madwar 200 cm² biex b'hekk jinkiseb sottostrat ta' umdità li huwa fond madwar 5-6 cm meta tiżdied massa ta' sottostrat xotta ta' 500 sa 600 g. Id-disinn tal-ghatu tal-kontenitur għandu jippermetti l-iskambju gassuż bejn is-sottostrat u l-atmosfera u l-aċċess għad-dawl (eż. permezz ta' għatu trasparenti mtaqqab) filwaqt li jiġi evitat li d-dud jahrab. Jekk l-ammont tas-sottostrat tat-test użat huwa sostanzjalment iktar minn 500 sa 600 g għal kull kontenitur tal-ittestjar, in-numru ta' dud għandu jiżdied proporzjonalment.
10. Huwa meħtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:
- armadju tat-tnixxif;
 - sterjomikroskopju;
 - miter tal-pH u fotometru;
 - imwieżen preċizi xierqa;
 - tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;
 - tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni jkollhom l-ghotjien);
 - inkubatur jew kamra żghira b'arja kondizzjonata;
 - pinzetti, ganċijiet jew ingassi;
 - banjumarija.

▼ **M6****Preparazzjoni tal-hamrija artifiċjali**

11. F'dan it-test tintuża hamrija artifiċjali (5)(7) bil-kompożizzjoni li ġejja (abbazi tal-piżijiet xotti, li titmixxef għal piż kostanti ta' 105 °C):

- 10 fil-mija tal-pit ta' sfanju (qrib kemm jista' jkun għal pH 5,5-6,0, l-ebda fdalijiet tal-pjanta viżibbli, mithun irqiq, imnixxef għal kontenut ta' umdità mkejje);
- 20 fil-mija tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 fil-mija);
- 0,3 sa 1,0 % karbonat tal-kalċju (CaCO_3 , pulverizzat, grad tal-analiżi) biex jinkiseb pH inizjali ta' $6,0 \pm 0,5$.
- 70 % ramel kwarzuz imnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' CaCO_3 mehtieg), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron.

Nota 1: L-ammont ta' CaCO_3 mehtieg sejjer jiddependi fuq il-komponenti tas-sottostrat tal-hamrija inkluż l-ikel, u għandu jiġi ddeterminat mill-kejl tas-sottokampjuni tal-hamrija eżattament qabe it-test. Il-pH jitkejjel f'kampjun imhallat f'1 M ta' soluzzjoni ta' klorur tal-potassju (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M klorur tal-kalċju (CaCl_2) (13).

Nota 2: Il-kontenut tal-karbonju organiku tal-hamrija artifiċjali jaf jitnaqqas eż. billi jitnaqqas il-kontenut ta' pit sa 4-5 % u jizdied il-kontenut ta' pit skont dan. B'tali tnaqqis fil-kontenut tal-karbonju organiku, il-possibbiltajiet ta' adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test mill-hamrija (karbonju organiku) jistgħu jitnaqqsu u d-disponibbiltà tas-sustanza kimika tat-test għad-dud tista' tizdied. Intwera li *Eisenia fetida* jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità dwar ir-riproduzzjoni meta jiġi ttestjat f'hamrija tal-ghelieqi b'kontenut ta' karbonju organiku iktar baxx (eż. 2,7 %) (14), u hemm esperjenza li dan jista' jintlaħaq ukoll f'hamrija artifiċjali b'5 % pit. Għalhekk, mhuwiex mehtieg qabel tintuża tali hamrija f'test finali li tintwera l-adegwatezza tal-hamrija artifiċjali biex it-test ikun jista' jikkonforma mal-kriterji ta' validità sakemm il-kontenut tal-pit jitbaxxa iktar minn dak speċifikat hawn fuq.

Nota 3: Meta tintuża hamrija naturali f'ttestjar addizzjonali (eż. ta' livell oghla), għandha tintwera wkoll l-adegwatezza tal-hamrija u l-ilhuq tal-kriterji ta' validità tat-test.

12. Il-kostitwenti xotti tal-hamrija jithalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira) f'żoni b'ventilazzjoni tajba. Qabel jinbda t-test, il-hamrija artifiċjali xotta tixxarrab billi jizdied biżżejjed ilma mhux dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut ta' ilma finali, li huwa 40 % sa 60 % tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima (li tikkorrispondi għal 50 ± 10 % tal-massa xotta ta' umdità). Dan sejjer jipproduċi sottostrat li ma għandu ebda ilma permanenti jew liberu meta jiġi kkompressat bl-idejn. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-hamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2, ISO 11274 (15) jew standard tal-UE ekwivalenti.
13. Jekk is-sustanza kimika tat-test tiġi applika fuq wiċċ il-hamrija jew tithallat fil-hamrija minghajr l-ilma, l-ammont finali tal-ilma jista' jithallat fil-hamrija artifiċjali matul il-preparazzjoni tal-hamrija. Jekk is-sustanza kimika tat-test tithallat fil-hamrija flimkien ma' xi ilma, l-ilma addizzjonali jista' jizdied flimkien mas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 19).
14. Il-kontenut ta' umdità fil-hamrija huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test skont ISO 11465 (16) jew l-istandard tal-UE ekwivalenti, u l-pH tal-hamrija skont l-Appendiċi 3 jew l-ISO 10390 (13) jew standard tal-UE ekwivalenti. Dawn id-determinazzjonijiet għandhom jitwettqu f'kampjun ta' hamrija ta'

▼ M6

kontroll u kampjun ta' kull hamrija ta' konċentrazzjoni tat-test. Il-pH tal-hamrija ma għandux jiġi aġġustat meta s-sustanzi kimiċi aċidużi jew bażiċi huma ttestjati. Il-kontenut ta' umdità għandu jiġi ssorveljat matul it-test billi l-kontenituri jintiżnu kull ċertu żmien (ara l-paragrafi 26 u 30).

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

15. L-ispeċi użata fit-test hija *Eisenia fetida* jew *Eisenia andrei* (1)(2). Biex jinbeda t-test huwa mehtieg dud adult li għandu bejn xahrejn u sena u bi klitellu. Id-dud għandu jintgħazel minn kultura sinkronizzata bi struttura ta' età relattivament omogċenja (Appendiċi 4). L-individwi f'grupp tal-ittestjar ma għandhomx ikunu differenti fl-età b'aktar minn 4 ġimghat.
16. Id-dud magħżul għandu jiġi akklimatizzat għal tal-inqas jum bit-tip ta' sottostrat ta' hamrija artifiċjali li għandu jintuża għat-test. Matul dan il-perjodu, id-dud għandu jingħalef bl-istess ikel li għandu jintuża fit-test (ara l-paragrafi 31 sa 33).
17. Gruppi ta' 10 dud għandhom jintiżnu individwalment biex il-gruppi jiġu assenjati b'mod każwali għall-kontenituri tat-test fil-bidu tat-test. Id-dud jinhasel qabel ma jintiżen (b'ilma dejonizzat) u l-ilma żejjed jitneħħa billi d-dud jitqiegħed għal ftit hin fuq il-karta filtru. Il-massa mxarrba tad-dud individwali għandha tkun bejn 250 u 600 mg.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

18. Jistgħu jintużaw żewġ metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: it-tahlit tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija (ara l-paragrafi 19-21) jew l-applikazzjoni ma' wiċċ il-hamrija (ara l-paragrafi 22-24). L-għażla tal-metodu xieraq tiddependi fuq il-fini tat-test. B'mod ġenerali, huwa rakkomandat it-tahlit tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija. Madankollu, jaf ikunu mehtieg proċeduri għal applikazzjoni li huma konsistenti bi prattika agrikola normali (eż. l-isprejjar tal-formulazzjoni likwida jew l-użu ta' formulazzjonijiet ta' pesticidi speċjali bħal granuli jew kisi taż-żerriegħa). Is-solventi użati fit-trattament tal-ghajjnuna tal-hamrija bis-sustanza kimika tat-test abbażi tat-tossiċità baxxa tagħhom għall-hniex u għandu jiġi inkluz kontroll tas-solventi xieraq fid-disinn tat-test (ara l-paragrafu 27).

It-tahlit tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

19. Soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test filma dejonizzat tiġi ppreparata immedjatament qabel jinbeda t-test f'kwantità biżżejjed għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni waħda. Jaf ikun mehtieg kosolvent biex tiġi ffaċilitata l-preparazzjoni tas-soluzzjoni tat-test. Huwa konvenjenti li tipprepara ammont ta' soluzzjoni mehtieġa biex jintlahaq il-kontenut ta' umdità finali (40 sa 60 % tal-kapaċità ta' zamma tal-ilma massima). Is-soluzzjoni tithallat sew mas-sottostat tal-hamrija qabel tiġi introdotta f'kontenitur tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma

20. Is-sustanza kimika tat-test tinħall f'volum żgħir ta' solvent organiku xieraq (eż. aċetun) u mbagħad tiġi sprejjata fuq kwantità żgħira ta' ramel kwarżuż irqiq. Imbagħad is-solvent jitneħħa b'evaporazzjoni f'għatu għad-dhahen għal tal-inqas żewġ minuti. Ir-ramel ittrattat imbagħad jithallat sew mal-hamrija artifiċjali mxarrba minn qabel. Imbagħad jiżdied u jithallat miegħu ilma dejonizzat (ammont mehtieġ) biex jintlahaq kontenut ta' umdità finali ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità massima ta' zamma tal-ilma. Imbagħad il-hamrija tkun lesta biex titqiegħed freċċipjenti tal-kontenituri tat-test. Għandha tingħata attenzjoni li xi solventi jaf ikunu tossiċi għall-hniex.

▼ M6

Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma u solventi organiċi

21. Tiġi ppreparata tahlita li tinkludi 10 g ta' ramel kwarzuż mithun irqiq bi kwantità tas-sustanza kimika tat-test meħtieġa biex tintlaħaq il-koncentrazzjoni tat-test fil-hamrija. It-tahlita mbagħat tithallat sew bil-hamrija artifiċjali mxarrba minn qabel. Imbagħad jiżdied u jithallat miegħu ilma dejonizzat (ammont meħtieġ) biex jintlaħaq kontenut ta' umdità finali ta' 40 sa 60 % tal-kapaċità ta' zamma tal-ilma massima. Il-hamrija mbagħad tkun lesta biex titqiegħed f'reċipjenti tal-kontenituri tat-test.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-hamrija

22. Il-hamrija tiġi ttrattata wara li jiżdied id-dud. Il-kontenituri tat-test l-ewwel jintlew bis-sottostrat ta' hamrija umda u d-dud miżun jitqiegħed fuq il-wiċċ. Dud b'saħħtu normalment iħaffer toqba mill-ewwel fis-sottostrat u għaldaqstant dak kollu li jibqa' fuq il-wiċċ wara 15-il minuta jiġi ddefinit bħala danneġġjat u għandu jiġi ssostitwit. Jekk id-dud jiġi sostitwit, dak ġdid u dak sostitwit għandu jintiżen biex b'hekk il-piż haġ totali tal-grupp ta' espożizzjoni tad-dud u l-piż totali tal-kontenitur bid-dud fil-bidu jkun magħruf.
23. Is-sustanza kimika tat-test hija applikata. Ma għandhiex tiżdied mal-hamrija fi żmien nofs siegħa mill-introduzzjoni tad-dud (jew jekk id-dud ikun preżenti fuq wiċċ il-hamrija) biex b'hekk tiġi evitata kwalunkwe espożizzjoni diretta għas-sustanza kimika tat-test b'kontatt mal-ġilda. Meta s-sustanza kimika tat-test hija pestiċida jaf ikun xieraq li tiġi applikata fuq wiċċ il-hamrija billi tiġi sprejata. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi applikata fuq wiċċ il-hamrija kemm jista' jkun b'mod uniformi permezz ta' apparat tal-isprejjar fuq skala tal-laboratorju xierqa biex tiġi stimulata l-applikazzjoni tal-isprej fis-sit. Qabel l-applikazzjoni, l-ghatu tal-kontenitur tal-ittejtjar għandu jitneħħa u jiġi sostitwit minn inforra li tipproteġi l-ħitan tal-ġenb tal-kontenitur mill-isprej. L-inforra tista' tkun magħmula minn kontenitur tat-test bil-bażi mneħħija. L-applikazzjoni għandha ssir f'temperatura ta' 20 ± 2 °C ta' varjazzjoni u għal soluzzjonijiet milwiema, emulsjonijiet jew dispersjonijiet b'rata ta' applikazzjoni ta' bejn 600 u 800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$. Ir-rata għandha tiġi vverifikata permezz ta' teknika ta' kalibrazzjoni xierqa. Għandhom jiġu applikati formulazzjonijiet speċjali bħal granuli jew kisi taż-żerriegħa b'mod konsistenti mal-użu agrikolu.
24. Il-kontenituri tat-test għandhom jithallew miftuha għal perjodu ta' siegħa biex jippermettu l-evaporazzjoni tas-solvent volatili assoċjat mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tingħata attenzjoni biex l-ebda dud ma jaħrab mir-reċipjenti tat-test f'dan il-perjodu ta' ħin.

PROCEDURA

Gruppi tat-test u kontrolli

25. Hija rakkomandata tagħbija ta' 10 ħniex f'500 — 600 mg ta' massa xotta ta' hamrija artifiċjali (jiġifieri 50-60 mg ta' hamrija għal kull dudu). Jekk jintużaw kwantitajiet ikbar ta' hamrija, kif jista' jkun il-każ fil-pestiċidi tat-test b'mod speċjali ta' applikazzjoni bħall-kisi taż-żerriegħa, it-tagħbija ta' 50-60 g ta' hamrija għal kull dudu għandha tinżamm billi jiżdied in-numru ta' dud. Għal kull kontroll jiġu ppreparati għaxar dud u kontenitur ta' trattament. Id-dud jinħasel bl-ilma u jintmesah u mbagħad jitqiegħed fuq karta assorbenti għal perjodu qasir biex l-ilma żejjed ikun jista' jissaffa.
26. Biex jiġu evitati żbalji sistematiċi fid-distribuzzjoni tad-dud fil-kontenituri tal-ittejtjar, l-omoġenità tal-popolazzjoni tat-test għandha tiġi ddeterminata billi jintiżnu b'mod individwali 20 dudu li ttiehed kampjun tagħhom b'mod każwali mill-popolazzjoni li minnha għandhom jittieħdu d-dud tat-test. Wara li tiġi żgurata l-omoġenità, jintgħazlu, jintiżnu u jiġu assenjati lottijiet ta' dud f'kontenituri tat-test permezz ta' proċedura ta' randomizzazzjoni. Wara ż-żieda tad-dud tat-test, għandu jitkejjel il-piż ta' kull kontenitur tal-ittejtjar

▼ M6

biex jiġi żgurat li jkun hemm piż inizjali li jista' jintuża bħala l-bażi għall-monitoraġġ tal-kontenut ta' umdità fil-ħamrija matul it-test kollu kif deskritt fil-paragrafu 30. Imbagħad il-kontenituri tat-test jitgħattew kif deskritt fil-paragrafu 9 u jitqiegħdu f'kompartiment tat-test.

27. Jiġu ppreparati kontrolli xierqa għal kull wieħed mill-metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test deskritti fil-paragrafi 18 sa 24. Il-proċeduri rilevanti deskritti huma segwiti għall-preparazzjoni tal-kontrolli hliet li s-sustanza kimika tat-test ma tiżdiedx. Għalhekk, fejn ikun xieraq, is-solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż jew veikoli oħra jiġu applikati mal-kontrolli f'konċentrazzjonijiet/ammonti konsistenti ma' daww użati fit-trattamenti. Fejn jintuża solvent jew veikolu ieħor biex tiżdied is-sustanza kimika tat-test, għandu jiġi ppreparat u ttestjat ukoll kontroll addizzjonali mingħajr il-veikolu jew is-sustanza kimika tat-test biex jiġi żgurat li l-veikolu ma għandu ebda piż fuq ir-riżultat.

Kundizzjonijiet tat-test

28. It-temperatura tat-test hija 20 ± 2 °C. It-test jitwettaq taħt ċikli fid-dawl u fid-dlam kkontrollati (preferibbilment 16-il siegħa fid-dawl u 8 siegħa fid-dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux fiz-zona tar-reċipjenti tat-test.
29. Il-kontenituri tat-test mhumieks ossiġenati matul it-test iżda d-disinn tar-reċipjenti tat-test għandu jipprovdi opportunità għall-iskambju ta' gass filwaqt li jillimita l-evaporazzjoni ta' umdità (ara paragrafu 9).
30. Il-kontenut ta' ilma tas-sottostrat ta' ħamrija fil-kontenituri tat-test jinżamm matul it-test kollu billi jerġġhu jiġu ppeżati l-kontenituri tat-test (mingħajr l-ghotjen tagħhom) perjodikament. It-telf huwa rifornit kif meħtieġ b'ilma dejonizzat. Il-kontenut ta' ilma ma għandux ivarja b'aktar minn 10 % minn dak fil-bidu tat-test.

Tagħlif

31. Kwalunkwe ikel ta' kwalità li ntwera li huwa xieraq għal tal-inqas għaż-żamma tal-piż tad-dud matul it-test, huwa kkunsidrat aċċettabbli. L-esperjenza wriet li l-ħafur, id-demel tal-baqar jew iż-żwiemel huwa ikel adattat. Għandhom isiru verifiki biex jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel minn fejn jinkiseb id-demm mhumieks soġġetti għal medikazzjoni jew trattament b'sustanzi kimiċi, bħalma huma promoturi tat-tkabbir, nematocidi jew prodotti veterinarji simili li jistgħu jaffettwaw b'mod ħażin id-dud matul it-test. Huwa rakkomandat demel tal-baqar miġbur b'mod proprju, peress li l-esperjenza wriet li d-demel tal-baqar disponibbli fil-kummerċ użat bħala fertilizzant fil-ġonna jaf ikollu effetti avversi fuq id-dud. Id-demel għandu jitnixxef bl-arja, jintahan irqiq u jiġi pasturizzat qabel l-użu.
32. Kull lott gdid ta' ikel, għandu jintgħalef lil kultura tad-dud mhux tat-test qabel jintuża f'test biex jiġi żgurat li huwa ta' kwalità xierqa. It-tkabbir u l-produzzjoni ta' fosdqiet ma għandhomx jitnaqqsu meta mqabbel ma' dud miżmum f'sottostrat li ma fihx il-lott il-gdid ta' ikel (kundizzjonijiet kif deskritti fil-metodu ta' ttestjar C.8(4)).
33. L-ikel l-ewwel huwa pprovdut jum wara ż-żieda tad-dud u l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-ħamrija. Madwar 5 g ta' ikel jinfirx fuq wiċċ il-ħamrija ta' kull kontenitur u jixxarrab b'ilma mhux dejonizzat (madwar 5 ml sa 6 ml f'kull kontenitur). Minn hemm 'il quddiem l-ikel huwa pprovdut darba f'gimgha matul il-perjodu ta' ttestjar ta' 4 gimghat. Jekk l-ikel jibqa'

▼ **M6**

ma jittikkilx, il-proporzjon għandu jitnaqqas biex jiġi evitat tkabbir jew iffurmar funzjali. L-adulti jitnehhew mill-hamrija fit-28 jum tat-test. Imbagħad jingħataw 5 g oħra ta' ikel f'kull kontenitur tat-test. Ma jsir ebda tagħlif iehor matul l-4 ġimgħat li jifdal mit-test.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

34. L-għarfien minn qabel tat-tossicità tas-sustanza kimika tat-test għandu jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa, eż. minn test akut (4) u/jew minn studji tas-sejba tal-medda. Meta jkun meħtieġ, test tas-sejba tal-medda jitwettagħ pereżempju, b'ħames konċentrazzjonijiet tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg (massa xotta tal-hamrija). Replikati wieħed għal kull trattament u kontroll huwa suffiċjenti. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda hija ġimgħatejn u l-mortalità tiġi vvalutata f' tmiem it-test.

Disinn sperimentali

35. Peress li ma tistax tiġi predefinita statistika ta' sommarju unika għat-test, dan il-metodu ta' ttestjar jahseb għad-determinazzjoni tal-NOEC u l-EC_x. X'aktarx li tkun meħtieġa NOEC minn awtoritajiet regolatorji għall-futur prevedibbli. Fil-futur qarib jista' jiġi adottat użu iktar mifrux tal-EC_x, li jirriżulta minn kunsiderazzjonijiet statistiċi u ekoloġiċi. Għalhekk, huma proposti tliet disinji, abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test ta' metodu ta' ttestjar tar-riproduzzjoni tal-enchytraeids (17).

36. Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wieħed għandu jzomm f'moħħu dan li ġej:

— Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas ħames/ n_{max} -il konċentrazzjoni f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 2,0.

— Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC₁₀, EC₅₀), huwa rakkomandat numru adegwat ta' konċentrazzjonijiet biex jiġu kkawżati tal-inqas erba' risponsi b'medja statistikament differenti b'mod sinifikanti f'dawn il-konċentrazzjonijiet. Huma rakkomandati tal-inqas żewġ repliki għal kull konċentrazzjoni u sitt repliki ta' kontroll. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjoni.

— Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbiżx 1,8.

Durata u kejl tat-test

37. Fit-28 Jum, id-dud adult haj kien osservat u magħdud. Kwalunkwe imġiba mhux tas-soltu (eż. inabbiltà li jhaffru fil-hamrija; u nuqqas ta' ċaqliq) u fil-morfologija (eż. feriti miftuħa) tiġi rreġistrata. Id-dud adult kollu mbagħad jitneħħa mir-riċipjenti tat-test u jingħadd u jintizen. It-trasferiment tal-hamrija li fiha d-dud lejn trej nadif qabel il-valutazzjoni jista' jiffaċilita t-tiftix għall-adulti. Id-dud estratt mill-hamrija għandu jinhasel qabel ma jintizen (b'ilma dejonizzat) u l-ilma żejjed jitneħħa billi d-dud jitqiegħed għal ftit hin fuq il-karta filtru. Kwalunkwe dudu li ma jinstabx f'dan il-hin għandu jiġi rreġistrat b'ħala mejjet, peress li wieħed jassumi li tali dud miet u ddekompona qabel il-valutazzjoni.

▼ M6

38. Jekk il-ħamrija tneħhiet mill-kontenituri din terġa' titpoġġa' f'postha (mingħajr id-dud adult iżda b'kwalunkwe fosdqiet li ġew prodotti). Il-ħamrija mbagħad tiġi inkubata għal erba' ġimgħat ohra fl-istess kundizzjonijiet tat-test hliet li t-tagħlif isir biss darba fil-bidu ta' din il-fażi tat-test (ara l-paragrafu 33).
39. Fi tmiem it-tieni perjodu ta' 4 ġimgħat, in-numru ta' fireh li jfaqqsu mill-fosdqiet fil-ħamrija tat-test u n-numru ta' fosdqiet jiġi ddeterminat permezz tal-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 5. Is-sinjali kollha ta' dannu jew ħsara lid-dudu għandhom jiġu rreġistrati wkoll matul il-perjodu tal-ittestjar kollu.

Test tal-limitu

40. Jekk ma jiġu osservati ebda effetti fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg. Test tal-limitu sejjer jipprovi l-opportunità biex juri li l-NOEC għar-riproduzzjoni hija ikbar mill-konċentrazzjoni tal-limitu filwaqt li jitnaqqas in-numru ta' dud użat fit-test. Għandhom jintużaw tmien repliki kemm għall-ħamrija trattata kif ukoll il-kontroll.

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

41. Għalkemm tingħata harsa ġenerali fl-Appendiċi 6, ma tingħata ebda gwida statistika definittiva għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar f'dan il-metodu ta' ttestjar.
42. Punt ta' tmiem minnhom huwa l-mortalità. Il-bidliet fl-imġiba (eż. l-inabbiltà biex tithaffer il-ħamrija; ma jiċċaqalqux u jserjhu mal-ħajt tal-ħġieg tar-recipient tat-test) u l-morfologija (eż. l-preżenza ta' feriti miftuħa) tad-dud adult għandhom għalhekk jiġu rreġistrati wkoll flimkien mal-preżenza ta' kwalunkwe frieh. L-analiżi probit (18) jew ir-rigressjoni logistika għandhom normalment jiġu applikati biex tiġi ddeterminata l-LC₅₀. Madankollu, f'każijiet fejn dan il-metodu ta' analiżi mhuwiex xieraq (eż. jekk inqas minn tliet konċentrazzjonijiet bi qtil parzjali huma disponibbli), jistgħu jintużaw metodi alternattivi. Dawn il-metodi jistgħu jinkludu ċ-ċaqliq tal-medji (19), il-metodu Spearman-Kärber trimmjat (20) jew interpolazzjoni sempliċi (eż. medja ġeometrika ta' LC₀ u LC₁₀₀, kif ikkalkolat mill-għerq kwadrat ta' LC₀ immultiplikat b'LC₁₀₀).
43. Il-punt ta' tmiem l-iehor hija l-fekondità (eż. numru ta' frieh prodotti). Madankollu, bħal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' dannu l-ohra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll. L-analiżi statistika titlob il-medja aritmetika $\bar{x}$ u d-devjazzjoni standard għal kull trattament u għal kull kontroll għar-riproduzzjoni biex tkun ikkalkolata.
44. Jekk titwettaq analiżi tal-varjanza, id-devjazzjoni standard, s, u l-grad ta' libertà (df) jistgħu jiġu sostitwiti mill-istima miksuba mill-varjanza raggrup-pata miksuba mill-ANOVA u l-grad ta' libertà, rispettivament — sakemm il-varjanza ma tiddependix fuq il-konċentrazzjoni. F'dan il-każ, uża l-varjanzi uniċi tal-kontroll u t-trattamenti. Dawn il-valuri huma ġener-alment ikkalkolati minn softwer statistiku kummerċjali permezz ta' riżultati għal kull recipient bħala repliki. Jekk ir-raggruppar tad-dejta għall-kontrolli tas-solventi jidher raġonevoli iktar mill-ittestjar ma' wiehed minn daww, dawn għandhom jiġu ttestjati biex jiġi osservat jekk sinifikament differenti (għat-testijiet xierqa, ikkunsidra paragrafu 47 u l-Appendiċi 6).
45. Testjar u inferenza statistika ulterjuri tiddependi fuq jekk il-valuri tar-repliki humiex normalment distribwiti u humiex omogenji fir-rigward tal-varjanza tagħhom.

▼ M6

Stima tal-NOEC

46. L-applikazzjoni ta' testijiet qawwija għandha tiġi ppreferuta. Wiehed għandu juża informazzjoni eż. minn esperjenza preċedenti b'ring testing jew dejta storika oħra dwar jekk id-dejta storika hijiex distribwita b'mod approssimattiv normali. L-omoġeneità tal-varjanza (omoscedasticità) hija iktar kritika. L-esperjenza tgħid li l-varjanza hafna drabi tiżdied meta tiżdied il-medja. F'dawn il-każijiet, trasformazzjoni tad-dejta tista' twassal għal omoscedasticità. Madankollu, tali trasformazzjoni għandha tkun ibbażata fuq l-esperjenza b'dejta storika iktar milli dejta li tkun qiegħda tiġi investigata. B'dejta omoġenja, għandhom jitwettqu testijiet t multipli bħat-test ta' Williams ($\alpha = 0,05$, naha wahda) (21)(22) jew f'ċerti każijiet, it-test ta' Dunnett (23)(24). Għandu jiġi nnotat li, fil-każ ta' replikazzjoni mhux indaqs, il-valuri-t tat-tabella għandhom jiġu korretti kif issuggerit minn Dunnett u Williams. Xi drabi, minhabba varjazzjoni kbira, ir-risponsi ma jiżdidux/jonqsux b'mod regolari. F'dan il-każ ta' devjazzjoni qawwija mill-monotonicità, it-test ta' Dunnett huwa iktar xieraq. Jekk hemm devjazzjonijiet mill-omoscedasticità, jaf ikun raġonevoli li jiġu investigati l-effetti possibbli fuq il-varjanzi iktar mill-għir biex jiġi deċiż jekk it-testijiet-t jistgħu jiġu applikati mingħajr it-telf ta' hafna qawwa (25). Inkella, test-U multipli, it-test-U ta' Bonferroni skont Holm, (26), jew meta din id-dejta tesebixxi omoscedasticità iżda hija altrimenti konsistenti ma' rispons għad-doża monotonu sottostanti, test mhux parametrik iehor [eż. Jonckheere-Terpstra (27)(28) jew Shirley (29) (30)] jistgħu jiġu applikati u ġeneralment ikunu ppreferuti minn testijiet-t b'varjanza inugwali. (ara wkoll l-iskema fl-Appendiċi 6).
47. Jekk ikun twettaq test tal-limitu u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametriċi (normalità, omoġeneità), jista' jintuza t-test-t tal-Istudent parallel jew inkella l-proċedura ta' test-U ta' Mann-Whitney (31).

Estimi ta' EC_x

48. Biex jiġi kkalkolat kwalunkwe valur EC_x, jintużaw il-medji għal kull trattament għall-analiżi tar-rigressjoni (lineari jew mhux lineari), wara li tkun inkisbet funzjoni ta' rispons/doża xierqa. Għat-tkabbir tad-dud bħala rispons kontinwu, il-valuri EC_x- jistgħu jiġu stmati permezz ta' analiżi tar-rigressjoni xierqa (32). Fost il-funzjonijiet xierqa għal dejta kwantali (mortalità/sopravivenza u numru ta' wild prodotti), huma l-funzjonijiet sigmoid, loġistiċi jew Weibull, li fihom tnejn sa erba' parametri, li xi whud minnhom jistgħu jimmudellaw ukoll ir-risponsi ormetriċi. Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża ddahhlet b'analizi tar-rigressjoni lineari, għandha tinstab r^2 sinifikanti (koeffiċjent ta' determinazzjoni) u/jew gradjent bl-analiżi tar-rigressjoni qabel l-istima tal-EC_x billi jiddahhal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba b'analizi tar-rigressjoni. limiti ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati skont il-metodu ta' Fieller (iċċitat f'Finney f'18)) jew metodi xierqa moderni oħra.
49. Inkella, ir-rispons jiġi mmudellat bħala perċentwali jew proporzjon tal-parametru ta' mudell li huwa interpretat bħala r-rispons tal-medja ta' kontroll. F'dawn il-każijiet, il-kurva sigmojd (loġistika, ta' Weibull) normali hafna drabi malajr tista' tiddahhal fir-riżultati permezz ta' proċedura ta' rigressjoni probit (18). F'dawn il-każijiet, il-funzjoni ta' ppeżar għandha tiġi aġġustata għal risponsi metriċi kif mogħti minn Christensen (33). Madankollu, jekk tkun osservata ormeżi, l-analiżi probit għandha tiġi sostitwita minn funzjoni loġistika jew ta' Weibull b'erba' parametri, imdahhla minn proċedura ta' rigressjoni mhux lineari (34). Jekk funzjoni bejn ir-rispons u d-doża xierqa ma tistax tiddahhal mad-dejta, wiehed jista' juża metodi alternattivi biex tiġi stmata l-EC_x, u l-limiti tal-kunfidenza tagħha, bħall-Moving Averages wara l-proċedura Thompson (19) u l-proċedura Spearman-Kärber Trimmjata (20).

RAPPORT TAT-TEST

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

▼ **M6***Sustanza kimika tat-test:*

- deskrizzjoni definittiva tas-sustanza kimika tat-test, in-numru tal-lott u CAS, il-purità;
- il-proprjetajiet tas-sustanza kimika tat-test (eż. log Kow, is-solubbiltà fl-ilma, il-pressurejoni tal-fwar, il-kostant ta' Henry (H) u informazzjoni dwar id-destin u l-imġiba).

Organizmi tat-test:

- l-annimali tat-test użati: l-ispeċi, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organizmi u l-kundizzjonijiet tat-tgħammir;
- l-età, il-medda tad-daqs (massa) tal-organizmi tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

- dettalji tal-preparazzjoni għall-ħamrija tat-test;
- il-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-ħamrija;
- deskrizzjoni tat-teknika użata biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test lill-ħamrija;
- dettalji tas-sustanzi kimiċi awżiljari użati għall-ghoti tas-sustanza kimika tat-test;
- dettalji tal-kalibrazzjoni għat-tagħmir tal-isprejjar, jekk ikun xieraq;
- deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura sperimentali;
- id-daqs tal-kontenituri u l-volum tal-ħamrija tat-test;
- kundizzjonijiet tat-test: intensità tad-dawl, durata taċ-ċikli tad-dawl u d-dlam, it-temperatura;
- deskrizzjoni tar-regim ta' tagħlif, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati ta' tagħlif;
- il-pH u l-kontenut tal-ilma tal-ħamrija fil-bida u fi tmiem it-test.

Riżultati tat-test:

- il-mortalità tal-adulti (%) f'kull kontenitur tat-test fi tmiem l-ewwel 4 ġimgħat tat-test;
- il-massa totali ta' adulti fil-bidu tat-test f'kull kontenitur tat-test;
- il-bidliet fil-piż tal-ġisem tal-adulti ħajjin (% tal-piż inizjali) f'kull kontenitur tat-test wara l-ewwel erba' ġimgħat tat-test;
- in-numru ta' frieh prodotti f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;
- deskrizzjoni tas-sintomi ovvji u patoloġiċi jew bidliet distinti fl-imġiba;
- ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;
- l-LC₅₀, l-NOEC u/jew l-EC_x (eż. EC₅₀, EC₁₀) għar-riproduzzjoni jekk xi whud minnhom ikunu applikabbli b'intervalli ta' kunfidenza, u graff tal-mudell imdahħal għall-kalkolu tiegħu, l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati;
- plott tar-relazzjoni bejn id-doża u r-rispons;
- ir-riżultati applikabbli għal kull kontenitur tat-test;

Id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

- (1) Jaenicke, J. (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 — 282.

▼ **M6**

- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
- (4) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Test tat-tossicità akutatal-hniex.
- (5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.
- (7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.
- (12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- (14) 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.
- (15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality —Determination of water retention characteristics —Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality —Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravitric method, No. 11465. ISO, Geneve.
- (17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼ **M6**

- (18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361
- (26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494
- (33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organizmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC₅₀ hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit. F'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet tal-effett huma espressi bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-hamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-hamrija.

LC₀ (L-ebda konċentrazzjoni letali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li ma toqtolx xi wiehed mill-organizmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC₀ hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-hamrija tal-ittestjar.

LC₅₀ (Konċentrazzjoni letali medja) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 50 % tal-organizmi tat-test esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC₅₀ hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-hamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-hamrija.

LC₁₀₀ (Konċentrazzjoni letali totali) hija l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li toqtol 100 % tal-organizmi tal-ittestjar esposti f'perjodu ta' żmien partikolari. F'dan it-test, l-LC₁₀₀ hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-hamrija tal-ittestjar.

LOEC (Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) F'dan it-test, l-LOEC hija espressa bħala l-massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-hamrija tat-test jew bħala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull unità tal-erja tal-hamrija. Il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandhom normalment juru effett li huwa statistikament differenti mill-kontroll. Kwalunkwe devjazzjoni minn dan ta' hawn fuq għandha tiġi ġġustifikata fir-rapport tat-test.

NOEC (Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat) hija l-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test eżattament taht l-LOEC fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

Rata tar-riproduzzjoni: Numru medju ta' dud frieh prodott għal numru ta' adulti matul il-perjodu tat-test.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ **M6***Appendiċi 2***Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-hamrija**

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-hamrija nstab li huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (1).

Iġbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-hamrija tal-ittestjar permezz ta' apparat ta' kampjunar xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru mimlija bl-ilma u mbagħad qegħda fuq xtelliera f'banjumarija. It-tubu għandu jiddaħħal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-hamrija. Imbagħad għandu jithalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-hamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-hamrija għandu jithalla jibattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpoġġi t-tubu fuq saff ta' ramel kwarzuż mithun irqiq, imxarrab hafna ġewwa reċipjent mghotti (biex jiġi evitat li jinxf). Il-kampjun għandu mbagħad jintiżen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f' \% ta' massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

REFERENZI:

- (1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼ M6*Appendiċi 3***Determinazzjoni tal-pH tal-hamrija**

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH tal-hamrija huwa bbazat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO DIS 10390: Kwalità tal-Hamrija — Determinazzjoni tal-pH (1).

Kwantità ddefinita ta' hamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-hamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' hamrija) f'hames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku (CaCl_2). Is-sospensjoni mbagħad tithallat sew għal hames minuti u mbagħad tithalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Imbagħad il-pH tal-fażi likwida titkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

REFERENZI:

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼ **M6***Appendiċi 4***Kulturi ta' Eisenia fetida /Eisenia andrei**

It-tniissil għandu preferibbilment isir f'kompartiment klimatiku f'20 °C ± 2 °C. F'din it-temperatura u bl-għoti ta' bizzżejded ikel, id-dud jimmatūra wara madwar xahrejn sa 3 xhur.

Iż-żewġ speċijiet jistgħu jiġu kkulturati f'firxa wiesgħa ta' skart tal-annimali. Il-midjum ta' tniissil rakkomandat huwa tahlita ta' 50:50 ta' demel u pit taż-żwiemel jew annimali tal-ifrat. Għandhom isiru verifiki biex jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel minn fejn jinkiseb id-demm mhumieq soġġetti għal mediċini jew trattament b'sustanzi kimiċi, bħalma huma promoturi tat-tkabbir, nematiċidi jew prodotti veterinarji simili li jistgħu jaffettwaw b'mod hażin id-dud matul it-test. Huwa rakkomandat demel awtomigbur minn sors "organiku", peress li l-esperjenza wriet li d-demel disponibbli fis-suq użat bħala fertilizzant fil-ġonna jaf ikollu effetti avversi fuq id-dud. Il-midjum għandu jkollu valur ta' pH ta' madwar 6 sa 7 (aġġustat bil-karbonat tal-kalċju), konduttività jonika baxxa (inqas minn 6 mS/cm jew 0,5 % konċentrazzjoni ta' melħ) u ma għandux ikun ikkontaminat b'mod eċċessiv b'ammonijaka jew awrina tal-annimali. Is-sottostrat għandu jkun umdu iżda mhux imxarrab wisq. Il-kaxx ta' tniissil ta' kapaċità ta' 10 sa 50 litru huma xierqa.

Biex jinkiseb dud ta' età u daqs standard (massa), l-aħjar huwa li l-kultura tinbeda b'fosdqiet. Ladarba tiġi stabbilita l-kultura, din tinzamm billi d-dud adult jitqiegħed f'kaxxa tat-tniissil b'sottostrat ġdid għal 14-il jum sa 28 jum biex ikunu jistgħu jiġu prodotti iktar fosdqiet. L-adulti mbagħad jitneħħew u d-dud frieh prodott mill-fosdqiet jintuża bħala bażi għall-kultura li jmiss. Id-dud jingħalef kontinwament bi hmiēg tal-annimali u jiġi ttrasferit f'sottostrat ġdid minn żmien għall-iehor. L-esperjenza wriet li demel tal-baqar jew il-hnieżer mithun irqiq, imnixeḡ bl-arja jew il-hafur huwa ikel xieraq. Għandu jiġi żgurat li l-baqar jew iż-żwiemel li minnhom jinkiseb id-demel mhumieq soġġetti għal trattament mediku b'sustanzi kimiċi, bħal promoturi tat-tkabbir, li jistgħu jaffettwaw hażin id-dud matul kultura b'terminu twil. Id-dud li jfaqqas minn fosdqiet jintuża għall-ittestjar meta jkollu bejn xahrejn u 12-il xahar u huwa kkunsidrat adult.

Id-dud jista' jiġi kkunsidrat b'saħħtu jekk jiċċaqtaq fis-sottostrat, ma jippruvax jitlaq is-sottostrat u jirriproduċi kontinwament. L-eżawriment tas-sottostrat huwa indikat minn dud li jiċċaqtaq bil-mod hafna u li jkollu tarf ta' wara isfar. F'dan il-każ, huwa rakkomandat il-provvediment ta' sottostrat ġdid u/jew tnaqqis fid-densità tal-hażna.

▼ M6

Appendiċi 5

Tekniki għall-ghadd ta' dud frieh imfaqqas minn fosdqiet

It-tqassim bl-idejn ta' dud mis-sottostrat tal-ħamrija jiehu ħafna hin. Għalhekk huma rakkomandati żewġ metodi alternattivi:

- (a) Il-kontenituri tat-test jitqieghdu f'banjumarija inizjalment f'temperatura ta' 40 °C li iżda titla' għal 60 °C. Wara perjodu ta' madwar 20 minuta, id-dud frieh għandu jidher f'wiċċ il-ħamrija minn fejn jista' jitnehħa u jingħadd faċilment.
- (b) Il-ħamrija tal-ittestjar jista' jinħasel billi jingħadda minn passatur permezz tal-metodu żviluppat minn van Gestel et al. (1) sakemm il-pit u d-demel jew il-ħafur mizjud mal-ħamrija kienu mithuna għal trab irqiq. Żewġ passaturi b'daqs tax-xibka ta' 0,5 mm (dijametru ta' 30 cm) jitqieghdu fuq xulxin. Il-kontenut tal-kontenitur tat-test jinħasel permezz tal-passaturi bi fluss qawwi ta' ilma tal-vit, u dan iħalli d-dud u l-fosdqiet zġhar fil-biċċa l-kbira tagħhom fil-passatur ta' fuq. Huwa importanti li jiġi nnotat li l-wiċċ gdid tal-passatur ta' fuq jinżamm imxarrab matul din l-operazzjoni biex b'hekk id-dud frieh iżomm f'wiċċ kisja ta' ilma, u b'hekk jiġi evitat li jgħaddi mill-pori tal-passatur. L-aqwa riżultati jinkisbu meta tintuza doċċja.

Ladarba s-sottostrat tal-ħamrija kollu jkun inħasel permezz tal-passatur, il-frieh u l-fosdqiet jistgħu jitlaħħlu mill-passatur għal skutella. Il-kontenut tal-iskutella mbagħad jithalla joqghod biex b'hekk il-fosdqiet il-vojta jkunu jistgħu jzommu f'wiċċ l-ilma u l-fosdqiet shah u d-dud zġhir ikun jista' jibqa' niżel s'isfel. L-ilma tal-wiċċ imbagħad jista' jitnehħa u d-dud u l-fosdqiet iż-zġhar jiġu ttrasferiti f'dixx petri li fih naqra ilma. Id-dud jista' jitnehħa għall-ghadd permezz ta' labra jew par pinzetti.

L-esperjenza wriet li l-metodu (a) huwa iktar adattat għall-estrazzjoni ta' dud frieh li jista' jitlaħħ anki permezz ta' passatur ta' 0,5 mm.

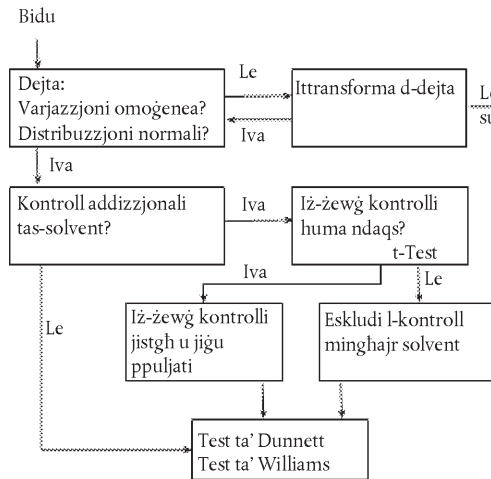
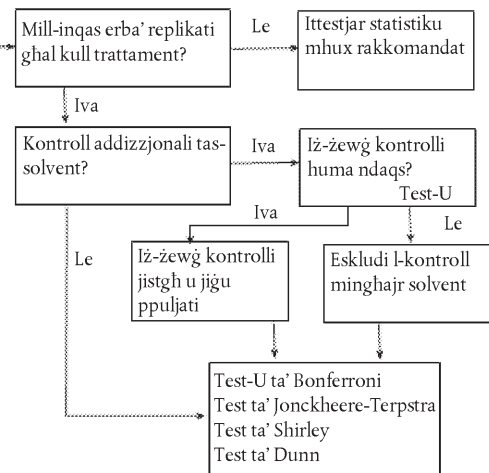
Għandha dejjem tiġi ddeterminata l-effiċjenza tal-metodu użat biex jitnehħa d-dud (u l-fosdqiet jekk ikun xieraq) mis-sottostrat tal-ħamrija. Jekk il-frieh jingħabru permezz tat-teknika tal-issortjar bl-idejn, huwa rakkomandat li l-operazzjoni titwettaq darbtejn fuq il-kampjuni kollha.

REFERENZI:

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

▼ **M6**

Appendiċi 6

Harsa ġenerali lejn il-valutazzjoni statistika tad-dejta (determinazzjoni tal-NOEC)**Testijiet parametriċi****Testijiet non-parametriċi**

▼ M6

C.34. DETERMINAZZJONI TAL-INIBIZZJONI TAL-ATTIVITÀ TAL-BATTERJI ANAEROBIČI — TNAQQIS FIL-PRODUZZJONI TAL-GASS MINN HAMA (DRENAĠĠ) B'DIĠESTJONI ANAEROBIKANTI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 224 tal-OECD (2007). Is-sustanzi kimiċi li jinharġu fl-ambjent akkwatiku jgħaddu kemm miż-zoni aerobiċi u anaerobiċi, fejn jistgħu jiġu degradati u/jew jistgħu jinibixxu l-attività batterika; f'xi każijiet jistgħu jibqgħu f'zoni anaerobiċi mhux disturbati għal deċennji jew iktar. Fil-trattament tal-ilma mormi, l-ewwel stadju, l-abitat primarju, huwa ajrobiku fil-likwidu supernatanti u anaerobiku fil-hama subnatanti. Dan huwa segwit fit-tieni stadju minn zona ajrobika fit-tank ta' arjazzjoni tal-hama attivata u zona anaerobika fil-hama tas-subnatanti fit-tank tas-soluzzjoni sekondarja. Il-hama minn dawn iż-żewġ stadji ġeneralment hija soġġetta għal trattament anaerobiku li jipproduċi metan u dijossidu tal-karbonju li normalment jintużaw biex jipproduċu l-elettriku. Fl-ambjent usa', is-sustanzi kimiċi li jilhqqu naqal f'bijiet, f'estwarji u l-baħar x'aktarx jibqgħu f'dawn iż-żoni anaerobiċi indefinitivament jekk ma jkunux bijodegradabbli. Idealment, proporzjonijiet ikbar ta' xi wħud mis-sustanzi kimiċi sejin jilhqqu dawn iż-żoni minhabba l-proprietajiet fiżiċi tagħhom, bħal solubbiltà baxxa fl-ilma, adsorbiment qawwi f'solidi sospizi, kif ukoll l-inabbiltà li jiġu bijodegradati ajrobikament.
2. Filwaqt li huwa rakkomandabbli li s-sustanzi kimiċi li jinhelsu fl-ambjent għandhom ikunu bijodegradabbli kemm f'kundizzjonijiet ajrobiċi kif ukoll anaerobiċi, huwa essenzjali li tali sustanzi kimiċi ma jinibixxu l-attività ta' mikro-organizmi f'xi zona minnhom. Fir-Renju Unit, kien hemm xi każijiet ta' inibizzjoni shiha tal-produzzjoni tal-metan ikkawżata minn, pereżempju, pentaklorofenol fl-iskariki industrijali, li jwassal għal trasport li jiswa hafna flus ta' hama inibita mid-diġesturi lejn siti "sikuri" u l-importazzjoni ta' hama b'diġestjoni tajba minn installazzjonijiet fil-qrib. Izda kien hemm hafna każijiet ta' tfixkil inqas sever tad-diġestjoni minn diversi sustanzi kimiċi oħrajn, inkluz aloidrokarburi alifatiċi (hasil fix-xott) u detergenti, li jwasslu għal indeboliment sinifikanti fl-effiċjenza tad-diġestur.
3. Metodu ta' ttestjar wiehed biss, C.11 (1), jitratta l-inibizzjoni tal-attività batterika (Respirazzjoni tal-hama attivata), li jivvaluta l-effett tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq ir-rata ta' tehid tal-ossigenu fil-prezenza tas-sottostrat. Il-metodu ntuża b'mod wiesgħa biex jagħti twissija bikrija ta' effetti dannużi possibbli ta' sustanzi kimiċi fuq it-trattament ajrobiku tal-ilmijiet mormija, kif ukoll l-indikazzjoni tal-koncentrazzjonijiet mhux inibitorji tas-sustanzi kimiċi tat-test li għandhom jintużaw fid-diversi testijiet għall-bijodegradabbiltà. Il-metodu ta' ttestjar C.43 (2) joffri opportunità limitata għad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test għall-produzzjoni tal-gass minn hama anaerobika, imħallta ma' parti wahda minn għaxra mill-koncentrazzjoni normali tas-solidi għall-preċiżjoni mehtieġa fil-valutazzjoni tal-bijodegradabbiltà percentwali. Peress li l-hama dilwita tista' tkun iktar sensittiva għal sustanzi kimiċi inibitorji, il-grupp tal-ISO ddecieda li jipprepara metodu li juża hama mhux dilwita. Tal-inqas ġew eżaminati tliet testi (mid-Danimarka, il-Germanja u r-Renju Unit) u fl-aħħar nett ġew ippreparati żewġ standards tal-ISO, wiehed permezz ta' hama mhux dilwita, ISO 13 641-1 (3) u l-iehor permezz ta' hama dilwita f'mitt parti, ISO 13 641-2 (4), biex jiġu rrapprezentati t-tajn u n-naqal li jkollhom popolazzjonijiet ta' batterji baxxi. Iz-żewġ metodi kienu soġġetti għal ring test (5); parti 1 kienet ikkonfermata bħala standard aċċettabbli izda kien hemm nuqqas ta' qbil dwar il-parti 2. Ir-Renju Unit ikkunsidra li, peress li parti sinifikanti mill-partiċipanti ma rrapportaw ebda produzzjoni ta' gass jew ftit li xejn, parzjalment minhabba li l-ispazju percentwali tal-gass kien għoli hafna (f'75 %) għall-aħjar sensittività, il-metodu jehtieġ iktar investigazzjoni.
4. Hidma iktar bikrija fir-Renju Unit (6)(7) iddeskriviet metodu manometriku permezz ta' hama ta' diġestjoni mhux dilwita, flimkien ma' hama minn dreñaġ mhux ipproċessat, fi flasks ta' 500 ml; l-apparat kien ineffiċjenti u l-intiema tal-hama mhux ipproċessata kienet qawwija. Iktar tard Wilson et al. applika b'suċċess l-apparat iktar kompatt u konvenjenti ta' Shelton and

▼ M6

Tiedje (8) kif żviluppat minn Battersby and Wilson (9). (10). Kawahara et al (11) ipprepara b'suċċess iktar hama standard fil-laboratorju għall-użu f'testijiet għal bijodegradabbiltà anaerobika u l-inibizzjoni minn numru ta' sustanzi kimiċi. Barra minn hekk, il-hama mhux ipproċessata b'hala s-sottostrat kienet issostitwita biex jitwettagħ test jew b'hama anaerobika dilwita f'mitt parti jew b'tajn, naqal eċċ. ta' attività batterjali baxxa.

5. Dan il-metodu jista' jipprovdi informazzjoni li hija utli fit-tbassir tal-effett probabbli ta' sustanza kimika tat-test fuq il-produzzjoni tal-gass fdigesturi anaerobiċi. Mandakollu, testijiet itwal biss li jissimulaw id-digesturi operattivi iktar mill-qrib jistgħu jindikaw jekk jistax isehh l-adattament tal-mikro-organizmi għas-sustanza kimika tat-test jew jekk sustanzi kimiċi li x'aktar jiġu adsorbiti u adsorbiti fil-hama jistgħux jakkumulaw sa konċentrazzjoni tossika f'perjodu ta' żmien itwal milli permiss f'dan it-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Alikwoti ta' taħlita ta' hama ta' digestjoni anaerobika (20 g/l sa 40 g/l tas-solidi totali) u soluzzjoni ta' sottostrat degradabbli huma inkubati wahedhom u simultanament ma' firxa ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'reċipjenti ssiġillati sa 3 ijiem. L-ammont ta' gass (metan flimkien ma' diossidu tal-karbonju) prodott jitkejjel biż-żieda fil-pressure (Pa) fil-fliexken. L-inibizzjoni perċentwali tal-produzzjoni ta' gass li jiġi magħhom id-diversi konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test hija kkalkolata mill-ammonti prodotti fil-fliexken tat-test u ta' kontroll rispettivi. L-EC₅₀ u konċentrazzjonijiet effettivi oħrajn jiġu kkalkolati minn plotts tal-inibizzjoni perċentwali mal-konċentrazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test jew, b'mod iktar komuni, il-logaritmu tagħha.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Is-sustanzi kimiċi tat-test normalment għandhom jintużaw fl-iktar forma pura li tkun faċilment disponibbli, peress li l-impurità f'xi sustanzi kimiċi, eż. l-klorofenoli, jistgħu jkunu iktar tossiċi mis-sustanza kimika tat-test innifisha. Madankollu, għandhom jiġu kkunsidrati l-htigijiet biex is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu ttestjati fil-forma li jiġu prodotti/jitqiegħdu għad-dispożizzjoni fis-suq biha. L-użu ta' prodotti formulati mhuwiex normalment rakkomandat, iżda għal sustanzi kimiċi tat-test li ma tantx jinhallu, l-użu tal-materjal formulat jaf ikun xieraq. Il-proprietajiet tas-sustanza kimika tat-test li għandhom ikunu disponibbli jinkludu s-solubbiltà fl-ilma u xi solventi organiċi, il-pressure tal-fwar, il-koeffiċjent ta' adsorbiment, l-idrolizi u l-bijodegradabbiltà f'kundizzjonijiet anaerobiċi.

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU

8. It-test huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi li jinhallu jew li ma jinhallux fl-ilma, inkluż sustanzi kimiċi volatili. Iżda attenzjoni speċjali hija meħtieġa b'materjali b'solubbiltà fl-ilma baxxa (ara ref. (12)) u ta' volatilità għolja. Barra minn hekk jistgħu jintużaw inokuli minn siti anaerobiċi oħrajn, eż. tajn, hamriji saturati, naqal. Sistemi batteriċi anaerobiċi li preċedement kienet ġew esposti għal sustanzi kimiċi tossiċi jistgħu jiġu adattati għaż-żamma tal-attività tagħhom fil-presenza ta' sustanzi kimiċi ksenobijotiċi. Inokuli minn sistemi batteriċi adattati jaf juru tolleranza ikbar għas-sustanzi kimiċi tat-test meta mqabbla mal-inokuli miksuba minn sistemi mhux adattati.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

9. Biex tiġi vverifikata l-proċedura, sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata billi jiġu kkonfigurati r-reċipjenti xierqa b'mod parallel b'hala parti mit-twettagħ ta' testijiet normali; 3, 5-diklorofenol intwera li huwa inibitur iktar konsistenti tal-produzzjoni tal-gass anaerobika, kif ukoll b'hala konsum tal-ossigenu mill-hama attivata u reazzjonijiet bijokimiċi oħrajn. Żewġ sustanzi kimiċi oħrajn intwerew li huma iktar inibitorji għall-produzzjoni tal-metan milli 3, 5-diklorofenol, jiġifieri methylene bis-tjoċjanat u pentaklorofenol iżda r-riżultati bihom ma ġewx invalidati. Pentaklorofenol mhuwiex rakkomandat peress li mhuwiex faċilment disponibbli f'forma pura.

▼ **M6****RIPRODUĊIBILTÀ TAR-RIŻULTATI**

10. F'ring test internazzjonali (5) kien hemm biss riproducibbiltà ġusta fil-valuri EC_{50} bejn 1-10 laboratorji partecipanti għal 3, 5-diklorofenol u l-aċidu sulfoniku 2-bromo-etan. (Il-medda tal-ewwel wiehed kienet 32 mg/l sa 502 mg/l u għal tal-aħħar 220-2 190 mg/l.)

Numru ta' laboratorji	Bhala mg/l			Bhala mg/g ta' hama		
	medja	s.d.	cv(%)	medja	s.d.	cv(%)
	3, 5-Diklorofenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	Aċidu sulfoniku 2-Bromo-etan					
10	1 058	896	85	34	26	76

Dejta EC_{50} minn ring test — hama mhux dilwita

11. Il-koeffiċjenti għoljin ta' varjazzjoni bejn il-laboratorji sa ċertu punt jirriflettu d-differenzi fis-sensittività tal-mikro-organizmi minhabba espożizzjoni minn qabel jew l-ebda espożizzjoni minn qabel għas-sustanza kimika tat-test jew sustanzi kimiċi kimikament relatati ohra. Il-preċiżjoni b'liema l-valur EC_{50} abbażi tal-koncentrazzjoni tal-hama kienet iddeterminata kienet ftit iktar ahjar mill-valur "volumetrik" (mg/l). It-tliet laboratorji li rrapportaw il-preċiżjoni tal-valuri EC_{50} tagħhom għal 3,5-diklorofenol urew koeffiċjenti ferm inqas ta' varjazzjoni (22, 9, u 18 % rispettivament għal EC_{50} mg/g) minn dawk tal-medji tal-ghaxar laboratorji kollha. Il-medji individwali għat-tliet laboratorji kienu 3,1, 3,2 u 2,8 mg/g, rispettivament. Il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni iktar baxxi, aċċettabbli fi hda il-laboratorji meta mqabbel mal-koeffiċjenti ferm oghla bejn il-valuri tal-laboratorju, jiġifieri 9-22 % cf. 92 %, jindikaw li hemm differenzi sinifikanti fil-proprietajiet tal-hama individwali.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Apparat**

12. Huwa mehtieg tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dan li ġej:

- a) **Inkubatur** — li jiffla għall-isparks u kkontrollat fi $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- b) **Reċipjenti tal-ittestjar tal-ħġieġ rezistenti għall-pressurejoni** ta' daqs nominali xieraq⁽¹⁾, kull wiehed imdahhal b'septum miksi li ma jgħaddix gass minnu, li jista' jiffla madwar 2 bar jew 2×10^5 Pa (għall-użu fil-kisi, eż. PTFE = politetrafluoreten). Il-fliexken tas-serum tal-ħġieġ b'volum nominali ta' 125 ml, b'volum reali ta' madwar 160 ml, issiġillati b'septa tas-serum⁽²⁾ u huma rakkomandati ċrieki tal-aluminju rbattuti; izda jistghu jintużaw b'suċċess fliexken b'volum totali ta' bejn 0,1 u litru;

⁽¹⁾ Id-daqs rakkomandat huwa 0,1 litru għal litru.

⁽²⁾ Huwa rakkomandat l-użu ta' septa tas-siliċju li ma jgħaddix gass minnhom. Huwa rakkomandat ukoll li l-impermeabbiltà għall-gass tal-ghotjien, speċjalment is-septa tal-gomma tal-butyl, tiġi ttestjata peress li diversi septa disponibbli fis-suq mhumiex impermeabbli biżżejjed għall-metan u xi septa ma jibqgħux impermeabbli meta jittaqqu b'labra fil-kundizzjonijiet tat-test.

— Huma rakkomandati septa miksiya li ma jgħaddix gass minnhom, li għandhom jintużaw għal sustanzi kimiċi volatili (xi septa kummerċjali huma relattivament irqaq, inqas minn 0,5 cm, u ma jibqgħux impermeabbli għall-gass wara li jittaqqu b'labra ta' siringa);

— Huma rakkomandati septa tal-gomma tal-butyl (madwar 1 cm), jekk is-sustanzi tat-test ma jkunux volatili (dawn normalment jibqgħu impermeabbli għall-gass wara li jittaqqu.)

— Qabel it-test, huwa rakkomandat li s-septa jiġu eżaminati b'attenzjoni għall-abbiltà tagħhom biex jibqgħu impermeabbli għall-gass wara li jittaqqu.

▼ **M6**c) Miter tal-pressjoni bi preċiżjoni ⁽¹⁾ u twaħhil mal-labra

Il-produzzjoni totali tal-gass (metan flimkien ma' dijossidu tal-karbonju) titkejjel permezz ta' miter tal-pressjoni adattat biex jippermetti l-kejl u l-ivventjar tal-gass prodott. Eżempju ta' strument xieraq huwa miter tal-pressjoni bi preċiżjoni li jinżamm fl-idejn imqabblad ma' labra ta' siringa; valv impermeabbli tridirezzjonali jiffaċilita r-rilaxx ta' pressjoni żejda (Appendiċi 1). Huwa mehtieg li l-volum intern tat-tubi u l-valv tat-transdjuser tal-pressjoni jinżamm baxx kemm jista' jkun, biex b'hekk l-izbalji introdotti minhabba li jiġi ttraskurat il-volum tat-tagħmir ikunu insinifikanti;

d) Kontenituri iżolati, għat-trasport tal-hama ta' diġestjoni;

e) Valvs għar-rilaxx tal-pressjoni tridirezzjonali;

f) Passatur, li għandu xibka kwadra ta' 1 mm;g) Kontenitur, għall-hama ta' diġestjoni, flixkun tal-ħgieg jew ta' polietilen b'densità għolja, b'kapasità ta' madwar 5 litri, mghammar b'hawwad u faċilitajiet biex jingħadda fluss ta' gass tan-nitroġenu (ara l-paragrafu 13) mill-ispazju fil-wieċ;h) filtri tal-membrana (0,2 µm) għall-isterilizzazzjoni tas-sottostrat;i) mikro siringi, għall-konnessjoni impermeabbli għall-gass tat-transdjuser tal-pressjoni (ara l-paragrafu 12(c)) għall-ispazju fil-wieċ tal-fliexken (ara l-paragrafu 12(b)); kif ukoll għaž-zieda ta' materjali tat-test b'likwidu li ma jinhallx fil-fliexken;j) kompartment tal-ingwanti, fakultattiv izda rakkomandat, bi ftit pressjoni pożittiva tan-nitroġenu.**Reaġenti**

13. Uża reaġenti tal-grad analitiku f'kull parti. Gass tan-nitroġenu, b'purità għolja b'kontenut ta' inqas minn 5 µl/l ta' ossiġenu, għandu jintuża f'kull parti.

Ilma

14. Jekk tkun mehtiega dilwizzjoni f'xi stadju, uża ilma dejonizzat li kien qabel tneħħitu l-arja minnu. Mhumiex mehtiega kontrolli analitiċi, izda kun żgur li l-apparat dejonizzanti jinżamm b'mod regolari. Uża ilma dejonizzanti anki għall-preparazzjoni ta' soluzzjonijiet ewlenin. Qabel iż-zieda ta' inokulu anaerobiku ma' kwalunkwe soluzzjoni jew dilwizzjoni tal-materjal tat-test, kun żgur li dawn ikunu mingħajr ossiġenu. Dan isir jew billi jingħadda gass tan-nitroġenu fl-ilma ta' dilwizzjoni (jew fid-dilwizzjonijiet) għal siegħa qabel ma jizdied l-inokulu, jew inkella billi jissahħan l-ilma ta' dilwizzjoni sal-punt tat-togħlija u jitberred għat-temperatura tal-kamra f'atmosfera mingħajr ossiġenu.

Hama Diġerita

15. Iġbor il-hama ta' diġestjoni attiva minn diġestur f'impjant tat-trattament tal-ilma mormi, jew inkella, minn diġestur tal-laboratorju, billi tittratta l-hama minn drenagg prinċipalment domestiku. Informazzjoni Prattika dwar il-hama minn diġestur tal-laboratorju tista' tinstab x'imkien ieħor (11). Jekk ikun maħsub l-użu ta' inkolu adattat, tista' tiġi kkunsidrata d-diġestjoni tal-hama minn impjant tat-trattament tad-drenagg industrijali. Uża fliexken b'għonq

⁽¹⁾ Il-miter għandu jintuża u jiġi kkalibrat f'intervalli regolari, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Jekk jintuża miter tal-pressjoni tal-kwalità preskritta, eż. kkapsulat b'membrana tal-azzar, mhija mehtiega ebda kalibrazzjoni fil-laboratorju. Dan għandu jiġi kkalibrat minn istitut illicenzjat fl-intervalli rakkomandati. Il-preċiżjoni tal-kalibrazzjoni tista' tiġi vverifikata fil-laboratorju b'kejl f'punt partikolari 1×10^5 Pa b'miter tal-pressjoni b'displej mekkaniku. Meta dan il-punt jitkejjel b'mod korrett, il-linearità sejra tibqa' l-istess ukoll. Jekk jintużaw apparati ta' kejl ohra (mingħajr kalibrazzjoni ċertifikata mill-manifattur), hija rakkomandata konverżjoni tul il-medda totali f'intervalli regolari (Appendiċi 2).

▼ **M6**

wiesgħa magħmula minn polietilen b'densità għolja jew materjal simili, li jista' jespandi, għall-gbir tal-hama. Żid il-hama fil-fliexken tal-kampjun sa madwar 1 cm mill-parti ta' fuq nett tal-fliexken, issikkahom, preferibbilment b'valv tas-sigurtà (paragrafu 12(e)), u poġġihom f'kontenituri iżolati (paragrafu 12(d)) biex tnaqqas il-qabża fit-temperatura, sakemm ma jiġux ittrasferiti f'inkubatur $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Meta titfah il-fliexken, ara li thalli toħroġ il-pressjoni tal-gass żejda jew billi tiftah b'attenzjoni s-sigill, jew permezz ta' valv tar-rilaxx tal-pressjoni tridirezzjonali (paragrafu 12(e)). Huwa preferibbli li l-hama tintuża fi żmien sagħtejn mill-gbir, inkella tinhażen f' $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ fi spazju fil-wiċċ tan-nitroġenu għal sa 3 ijiem, meta normalment isehh f'it telf ta' attività.

Twissija — Id-diġestjoni tal-hama tipproduċi gassijiet li jaqbd u li jipprezentaw riskji ta' nar u splużjoni: fiha wkoll organiżmi potenzjalment patogeni, b'hekk hu prekawżjonijiet xierqa waqt l-immanigġar tal-hama. Għal raġunijiet ta' sigurtà, tużax reċipjenti tal-ħġieg għall-gbir tal-hama.

Inokulu

16. Eżattament qabel l-użu, hallat il-hamrija billi thawwadha u tgħaddiha minn passatur b'xibka ta' 1 mm^2 (paragrafu 12(f)) fi fliexkun xieraq (paragrafu 12(g)) mill-isparju fil-wiċċ li minnu jingħadda fluss ta' nitroġenu. Warra k kampjun għall-kejl tal-konċentrazzjoni ta' solidi xotti totali (ara eż. ISO 11 923 (13) jew standard tal-UE ekwivalenti). B'mod ġenerali, uża l-hama mingħajr dilwizzjoni. Il-konċentrazzjoni ta' solidi, ġeneralment tkun bejn 2 % u 4 % (w/v). Iċċekkja l-valur pH tal-hama u, jekk ikun meħtieġ, aġġusta għal $7 \pm 0,5$.

Sottostrat tat-test

17. Holl 10 g brodu ta' nutrijenti (eż. Oxoid), 10 g ta' estratt tal-hmira u 10 g ta' glukożju-D filma dejonizzat u ddilwixxi sa 100 ml. Isterilizza b'filtrazzjoni permezz ta' filtru tal-membrana ta' $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (paragrafu 12(h)) u uża minnufih u aħżen f' $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ għal mhux iktar minn jum.

Sustanza kimika tat-test

18. Ipprepara soluzzjoni ewlenija għal kull sustanza kimika tat-test li tinhall fl-ilma biex ikun fiha, pereżempju, 10 g/l tas-sustanza kimika f'ilma ta' dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14). Uża volumi xierqa ta' dawn is-soluzzjonijiet ewlenin biex tipprepara t-tahlitiet ta' reazzjoni li fihom konċentrazzjonijiet iggradati. Inkella, ipprepara serje ta' dilwizzjonijiet ta' kull soluzzjoni ewlenija biex b'hekk il-volum miżjud fil-fliexken ikun l-istess għal kull konċentrazzjoni finali meħtieġa. Il-pH tas-soluzzjonijiet ewlenin għandu jkun aġġustat għal $7 \pm 0,2$, jekk ikun meħtieġ.
19. Għal sustanzi kimiċi tat-test li ma jinhallux biżżejjed fl-ilma, ikkonsulta ISO 10 634 (12) jew standard tal-UE ekwivalenti. Jekk ikun meħtieġ li jintuża solvent organiku, evita solventi bħal kloroform u tetraklorur tal-karbonju, li huma magħrufa sew li jinibixxu l-produzzjoni ta' metan. Ipprepara soluzzjoni ta' konċentrazzjoni xierqa ta' sustanza kimika li ma tinhallx fl-ilma f'solvent volatili xieraq, pereżempju, aċetun, dietileter. Żid il-volumi meħtieġa ta' soluzzjoni tas-solvent fil-fliexken tat-test vojta (paragrafu 12(b)) u evapora s-solvent qabel iż-żieda tal-hama. Għal trattamenti oħra uża ISO 10 634 (12) jew standard tal-UE ekwivalenti, iżda oqgħod attent li kwalunkwe aġent tensjoattiv użat biex jiġu prodotti emulsjonijiet jista' jkun inibitorju għall-produzzjoni ta' gass anaerobiku. Huwa mahsub li l-preżenza ta' solventi organiċi u l-aġenti emulsifikanti tikkawża artefatti, is-sustanza kimika tat-test tista' tiżdied direttament mat-tahlita tal-ittejtjar bħala trab jew likwidu. Is-sustanzi kimiċi volatili u s-sustanzi kimiċi tat-test b'likwidu li ma jinhallx fl-ilma jistgħu jiġu inokulati fi fliexken tas-serum, permezz ta' mikrosiringi (il-paragrafu 12(i)).

▼ **M6**

20. Żid is-sustanzi kimiċi tat-test fil-fliexken biex tagħti serje ġeometrika ta' konċentrazzjonijiet, pereżempju, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l u 15,6 mg/l. Jekk il-medda ta' tossiċità ma tkunx magħrufa minn sustanzi kimiċi simili, l-ewwel wettaq test preliminari tas-sejba tal-medda b'konċentrazzjoni ta' 1 000 mg/l, 100 mg/l u 10 mg/l biex taċċerta l-medda xierqa.

Sustanza kimika ta' referenza

21. Ipprepara soluzzjoni milwiema ta' 3,5-diklorofenol (10 g/l) billi żżid gradwalment l-ammont minimu ta' 5 mol/l soluzzjoni ta' idrossidu tas-sodju mas-solidu, waqt li thawwad, sakemm jinhall. Imbagħad żid ilma tad-dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) sal-volum meħtieġ; is-sonikazzjoni tista' tgħin it-tidwib. Jistgħu jintużaw sustanzi kimiċi ta' referenza oħra meta tkun inkisbet il-medda medja tal-EC₅₀ f'tal-inqas tliet testijiet b'inokuli differenti (sorsi differenti jew hinijiet differenti ta' ġbir).

INTERFERENZA/ŻBALJI

22. Xi konstitwenti ta' hama jistgħu preżumibbilment jirreagixxu ma' inibituri potenzjali jagħmluhom indisponibbli għal mikro-organizmi sabiex jagħtu inibizzjoni iżgħar jew ebda inibizzjoni. Barra minn hekk, jekk il-hama diġà kien fiha sustanza kimika li hija inibitorja, jistgħu jinkisbu riżultati żbaljati meta dik is-sustanza kimika kienet soġġetta għat-test. Apparti minn dawn il-possibbiltajiet, hemm numru ta' fatturi identifikati li jistgħu jwasslu għal riżultati foloz. Dawn huma elenkati fl-Appendiċi 3, flimkien mal-metodi li jeliminaw jew tal-inqas inaqqsu l-iżbalji.

PROCEDURA TAT-TEST

23. In-numru ta' repliki meħtieġa jiddependi fuq il-grad ta' preċiżjoni meħtieġa għall-indicijiet ta' inibizzjoni. Jekk is-sigilli tal-fliexken huma suffiċjente-ment impermeabbli matul it-test, ikkonfigura lott wiehed biss (tal-inqas triplikati) tal-fliexken tat-test f'kull konċentrazzjoni meħtieġa. Bl-istess mod, ikkonfigura lott wiehed ta' fliexken b'sustanza kimika ta' referenza u sett wiehed ta' kontrolli. Madankollu, jekk is-sigilli tal-fliexken iridu jittaqqbu darba jew xi ftit drabi biss, ikkonfigura lott (eż. triplikati) tal-fliexken tat-test għal kull intervall (t) li għalihom huma meħtieġa riżultati għall-konċentrazzjonijiet kollha ta' sustanza kimika tat-test li għandha tiġi ttestjata. Bl-istess mod, ikkonfigura lottijiet "t" tal-fliexken għas-sustanza kimika ta' referenza u għall-kontrolli.
24. Huwa rakkomandat l-użu ta' kaxxa tal-ingwanti (paragrafu 12(j)). Tal-inqas 30 minuta qabel ma jinbeda t-test, ibda fluss ta' gass tan-nitroġenu mill-kaxxa tal-ingwanti li fiha t-tagħmir kollu meħtieġ. Assigura li t-temperatura tal-hama hija fi f'dan 35 °C ± 2 °C matul l-immaniġġar u s-sigill tal-fliexken.

Test Preliminari

25. Jekk l-attività tal-hama mhijiex magħrufa, huwa rakkomandat li jitwettaq test preliminari. Ikkonfigura l-kontrolli biex pereżempju, jagħtu konċentrazzjonijiet ta' solidi ta' 10 g/l, 20 g/l u 40 g/l, flimkien mas-sottostrat iżda ma jużaw ebda sustanza kimika tat-test. Barra minn hekk, uża volumi differenti ta' tahlita ta' reazzjoni sabiex ikollok tlieta sa erba' proporzjonijiet ta' volumi ta' spazju fil-wieċ mal-volum tal-likwidu. Minn dawn ir-riżultati ta' volumi tal-gass prodotti f'diversi intervalli ta' żmien, il-kundizzjonijiet l-iktar xierqa li jippermettu żewġ kejljet kuljum li jipproduċu volumi sinifikanti ta' gass u jirrilaxxaw il-prezzjoni kuljum fl-aqwa sensitività⁽¹⁾ mingħajr biza' ta' splużjonijiet.

Żieda ta' sustanzi kimiċi tat-test

26. Żid sustanzi kimiċi tat-test li jinhallu fl-ilma ma' fliexken tat-test vojta (paragrafu 12(b)) bħala soluzzjonijiet milwiema (paragrafu 18). Uża

⁽¹⁾ Dan japplika għall-konfigurazzjoni sperimentali u l-kundizzjonijiet sperimentali fejn il-volumi ta' gass prodotti — u minn inbjanki tal-kontroll u minn reċipjenti li jindikaw inibizzjoni ta' 70 — 80 % — jistgħu jiġu stmati b'margini ta' żball aċċettabbli.

▼ M6

tal-inqas settijiet ta' triplikati ta' fliexken għal kull medda ta' konċentrazzjonijiet (paragrafu 20). Fil-każ ta' sustanza kimika tat-test li ma tinhallx u li ma tantx tinhall, injetta soluzzjonijiet ta' dawn f'solventi organiċi permezz ta' mikrosiringa fi fliexken vojta biex tagħti settijiet ta' repliki ta' kull hames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Evapora s-solvent billi tgħaddi għet ta' gass tan-nitroġenu fuq wiċċ is-soluzzjonijiet fil-fliexken tat-test. Inkella, zid sustanzi kimiċi solidi li ma jinhallux bħala ammonti mwiežna tas-solidu direttament mal-fliexken tat-test.

27. Jekk sustanzi kimiċi tat-test ta' likwidu ma jinhallux u li ma tantx jinhall fl-ilma ma jiżdidux ma' solvent, zidhom direttament b'mikrosiringa mal-fliexken tat-test wara li żżid l-inokulu u s-sottostrat tat-test (ara l-paragrafu 30). Is-sustanzi kimiċi tat-test volatili jistgħu jiżdidu bl-istess mod.

Żieda ta' inokulu u sottostrat

28. Hawwad volum xieraq ta' hama ta' diġestjoni mgħoddija minn passatur (ara l-paragrafu 16) fi fliexkun ta' 5 litri (il-paragrafu 12(g)), filwaqt li tgħaddi fluss ta' gass tan-nitroġenu mill-ispazju fil-wiċċ. Lahlaħ il-fliexken tat-test, li fihom soluzzjonijiet milwiema jew soluzzjonijiet ta' solvent evaporati tas-sustanzi kimiċi tat-test, bi fluss ta' gass tan-nitroġenu, għal madwar żewġ minuti biex tneħhi l-arja. Ferra' l-alikwoti, eż. 100 ml, tal-hama imħallta sew fil-fliexken tat-test permezz ta' pipetta b'ponta kbira jew ċilindru tal-kejl. Huwa essenzjali li timla l-pipetta f'pass wiehed sal-volum eżatt ta' hama meħtieġa minhabba l-faċilità li biha s-solidi tal-hama joqogħdu f'pothom. Jekk jittiehed ammont ikbar, battal il-pipetta u erga' ibda.
29. Imbagħad zid soluzzjoni ta' sottostrat suffiċjenti (paragrafu 17) biex tagħti konċentrazzjoni ta' 2 g/l ta' kull brodu ta' nutrijenti, estratt tal-ħmira u glukozju-D fit-tahlita, filwaqt li n-nitroġenu jkun għadu qiegħed jiftterra'. Dan li ġej huwa eżempju għal-lottijiet tal-ittestjar.

Konċentrazzjoni tal-massa finali tas-sustanza kimika tat-test fil-fliexken tat-test (mg/L)	Volum ta' sustanza kimika tat-test (ml)		Reaġenti u midjums (ml)		
	Soluzzjoni ewlenija a) 10 g/l para. 18	Soluzzjoni ewlenija b) 1 g/l para. 18	Ilma ta' dilwizzjoni para. 14	Inokulu para. 16	Sottostrat para. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volum totali tal-fliexkun = 160 ml. Volum tal-likwidu = 103 ml

Volum tal-gass = 57 ml, jew 35,6 % tal-volum totali.

30. Bl-istess mod aħsel b'gass tan-nitroġenu, fliexken tat-test vojta bizżejjed biex tindirizza kwalunkwe sustanza kimika tat-test ta' likwidu volatili u li ma jinhallx (ara l-paragrafu 27).

▼ M6

Kontrolli u sustanza kimika ta' referenza

31. Ikkonfigura tal-inqas settijiet triplikati ta' fliexken, li fihom hama u sottostrat biss, biex jaġixxu bhala kontrolli. Ikkonfigura wkoll fliexken ta' repliki li fihom hama u sottostrat flimkien ma' biżżejjed soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika ta' referenza 3,5-diklorofenol (paragrafu 21) biex tirriżulta f'koncentrazzjoni finali ta' 150 mg/l. Din il-koncentrazzjoni għandha tni-bixxi l-produzzjoni ta' gass b'madwar 50 %. Inkella, ikkonfigura medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika ta' referenza. Barra minn hekk, ikkonfigura erba' fliexken żejda għall-kejl tal-pH li fihom hama, ilma minghajr ossiġenu u sottostrat. Żid is-sustanza kimika tat-test maż-żewġ fliexken fl-ogħla konċentrazzjoni li tkun qiegħda tiġi ttestjata u zid ilma minghajr ossiġenu maż-żewġ fliexken li jifdal.
32. Assigura li l-fliexken kollha — is-sustanzi kimiċi tat-test u ta' referenza u l-kontrolli fihom l-istess volum (V_R) ta' likwidu; fejn ikun mehtieg, zid ilma minghajr ossiġenu (paragrafu 14) biex tagħmel il-volum. L-ispażju fil-wiċċ għandu jkun bejn 10 % u 40 % tal-volum tal-fliexkun, il-valur attwali jint-ghazel mid-dejta miksuba mit-test preliminari. Wara li żżid il-kostitwenti kollha fil-fliexken, nehhi l-labra li tforni l-gass u ssiġilla kull fliexkun b'tapp tal-gomma u għatu tal-aluminju (Paragrafu 12(b)), filwaqt li xxarrab it-tapp b'taqтира ta' ilma dejonizzat biex tiffaċilita d-dhul. Hawwad il-kontenut ta' kull fliexkun billi thawdu.

Inkubazzjoni tal-fliexken

33. Ittrasferixxi l-fliexken lejn l-inkubatur ikkontrollat b'termostat, preferibbilment mghammar b'xejker, u miżmum f'35 °C ± 2 °C. Il-fliexken huma inkubati fid-dlam. Wara madwar siegħa, ekwilizza l-pressjoni fil-fliexken sat-temperatura tal-atmosfera billi ddaħhal il-labra tas-siringa, imwahnha mal-miter tal-pressjoni (paragrafu 12(c)), mis-siġill ta' kull fliexkun, wara iftah il-valv sakemm il-miter tal-pressjoni jaqra zero u fl-aħħar aghlaq il-valv. Il-labra għandha tiddaħhal f'angolu ta' madwar 45° biex tevita tnixxija ta' gass mill-fliexken. Jekk il-fliexken jigu inkubati minghajr xejker, hawwad manwalment darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' inkubazzjoni totali biex tiġi ekwibrata s-sistema. Inkuba l-fliexken u aqlibhom biex tevita kwalunkwe telf ta' gass mis-septum. Madankollu, il-qlib mhuwiex xieraq f'kazijiet fejn is-sustanzi kimiċi tat-test li ma jinhallux jistghu jehlu ma' qiegh il-flask.

Ġestjoni tal-pessjoni

34. Meta l-fliexken jilhq 35 °C ± 2 °C, kejjel u rreġistra l-pH tal-kontenut ta' tnejn minn erba' fliexken ikkonfigurati għal dan il-ghan u armi l-kontenut; kompli inkuba l-fliexken li jifdal fid-dlam. Kejjel u rreġistra l-pessjoni fil-fliexken darbtejn kuljum fl-48 siegħa sat-72 siegħa ta' wara billi ddaħhal il-labra tal-miter tal-pessjoni mis-siġill ta' kull fliexkun, wara nixxef il-labra bejn il-kejl. Żomm il-partijiet kollha tal-fliexken fit-temperatura ta' inkubazzjoni matul il-kejl, li għandu jittiehed malajr kemm jista' jkun. Halli l-qari tal-pessjoni jistabbilizza u rreġistrah. Imbagħad iftah il-valv għal ventillazzjoni u aghlqu meta l-pessjoni taqra zero. Komplil-t-test ġeneralment għal 48 siegħa mill-hin tal-ewwel ekwalizzazzjoni tal-pessjoni, "hin 0" iddisinjat. In-numru ta' qari u ventillazzjonijiet għandu jkun limitat għal sustanzi kimiċi volatili għal wiehed (fi tmiem l-inkubazzjoni) jew tnejn biex jiġi minimizzat it-telf ta' sustanza kimika tat-test (10).
35. Jekk il-qari tal-pessjoni jkun negattiv, tiftaħ il-valv. Kultant takkumula umdità fil-labra tas-siringa u t-tubi, indikata minn qari tal-pessjoni fit negattiv. F'dan il-każ nehhi l-labra, hawwad it-tubi, nixxef b'karta assorbenti u wahnha labra għda.

Kejl tal-pH

36. Kejjel u rreġistra l-pH tal-kontenut ta' kull fliexkun wara l-kejl finali tal-pessjoni.

▼ **M6****DEJTA U RAPPORTAR****Espressjoni tar-riżultati**

37. Ikkalkola t-total u l-medja tal-pressjonijiet irreġistrati f'kull intervall ta' żmien għal kull sett ta' flieken ta' repliki u kkalkola l-medja grossa kumulattiva tal-pressjoni tal-gass f'kull intervall ta' żmien għal kull sett ta' repliki. Ipplottja kurvi tal-medja kumulattiva ta' produzzjoni tal-gass (Pa) mal-hin għall-kontroll, il-flieken tat-test u ta' referenza. Aghżel hin fuq il-parti lineari tal-kurva, ġeneralment 48 siegħa, u kkalkola l-inibizzjoni perċentwali (I) għal kull konċentrazzjoni mill-ekwazzjoni [1]:

$$I = (1 - P_t/P_c) \times 100 \quad [1],$$

fejn

I inibizzjoni perċentwali, f' %;

P_t il-pressjoni tal-gass prodotta b'materjal tat-test f'hin magħżul, f'Pascal (Pa);

P_c il-pressjoni tal-gass prodotta b'materjal tat-test fl-istess hin, f'Pascal (Pa).

Jaf ikun rakkomandabbli li ż-żewġ plots, jiġifieri Plott I jiddahhlu mal-konċentrazzjoni u anki mal-logaritmu tal-konċentrazzjoni biex b'hekk tint-ghażel il-kurva li hija eqreb mal-linearità. Ivvaluta l-valur EC₅₀ (mg/l) viżwalment jew b'analizi tar-rigressjoni mill-kurva eqreb tal-linearità. Għal finijiet komparattivi, jaf ikun utli li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tiġi espressa bħala mg sustanza kimika/g tas-solidi xotta totali. Biex tikseb din il-konċentrazzjoni, aqşam il-konċentrazzjoni volumetrika (mg/l) bil-konċentrazzjoni volumetrika tas-solidi ta' hama xotta (g/l) (paragrafu 16).

38. Ikkalkola l-inibizzjoni perċentwali milhuqa mill-konċentrazzjoni unika tas-sustanza kimika ta' referenza użata jew l-EC₅₀ jekk ikun ġie investigat numru biżżejjed ta' konċentrazzjonijiet.
39. Ikkonverti l-pressjoni medja tal-gass prodott fil-kontroll P_c(Pa) għall-volum b'referenza għall-kurva ta' kalibrazzjoni tal-miter tal-pressjoni (Appendiċi 2) u minn dan ikkalkola l-produzzjoni ta' gass, espressa bħala l-volum prodott f'48 siegħa minn 100 ml ta' hama mhux dilwita f'konċentrazzjonijiet ta' solidi ta' 2 % (20 g/l) sa 4 % (40 g/l).

Kriterji tal-validità

40. Riżultati mill-prova interlaboratorja tal-ISO (5) urew li s-sustanza kimika ta' referenza (3,5-diklorofenol) ikkawżat 50 % inibizzjoni tal-produzzjoni tal-gass f'medda ta' konċentrazzjonijiet ta' 32 mg/l sa 510 mg/l medja 153 mg/l (paragrafu 10). Din il-medda tant hija wiesgħa li ma jistgħux jiġu stabbiliti b'kunfidenzjalità limiti sodi għall-inibizzjoni bħala kriterji ta' validità; dan għandu jkun possibbli meta l-iżviluppi jkunu wrew kif għandhom jiġu prodotti inokuli iktar konsistenti. Il-volumi ta' gass prodott fil-flieken ta' kontroll f'48 siegħa varjaw minn 21 ml/g ta' materja xotta ta' hama sa 149 ml/g (medja ta' 72 ml/g). Ma kien hemm ebda relazzjoni ovvja bejn il-volum ta' gass prodott u l-valur EC₅₀ korrispondenti. Il-pH finali varja bejn 6,1 u 7,5.
41. It-test huwa kkunsidrat bħala validu, meta tinkiseb inibizzjoni ta' iktar minn 20 % fil-kontroll ta' referenza li jkun fih 150 mg/l ta' 3,5-diklorofenol, iktar minn 50 ml gass għal kull gramma materja xotta jiġi prodott fil-kontroll inbjank u l-valur pH jaqa' fil-medda ta' 6,2 sa 7,5 fi tmiem it-test.

Rapport tat-Test

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

Sustanza kimika tat-test

— isem komuni, isem tas-sustanza kimika, numru CAS, formula strutturali u proprjetajiet fiżiko kimiċi rilevanti;

▼ **M6**

- purità (impurità) tas-sustanza kimika tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

- volumi ta' kontenut ta' likwidu u ta' spazju fil-wiċċ fir-reċipjenti tat-test;
- deskrizzjonijiet tar-reċipjenti tat-test u kejl tal-gass (eż. tip ta' miter ta' pressjoni);
- applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u sustanza kimika ta' referenza għas-sistema tat-test, il-konċentrazzjonijiet tat-test użati u l-użu ta' kwalunkwe solvent;
- dettalji tal-inokulu użat: isem l-impjant ta' trattament tad-drenaġġ, deskrizzjoni tas-sors tal-ilma mormi ttrattat (eż. temperatura operattiva, hin ta' żamma tal-hama, drenaġġ prinċipalment domestiku jew skart industrijali, eċċ.), konċentrazzjonijiet tas-solidi, attività ta' produzzjoni tal-gass ta' diġestur anaerobiku, espożizzjoni preċedenti jew adattament minn qabel possibbli għal sustanzi kimiċi tossiċi jew sit ta' għbir tat-tajn, naqal eċċ;
- temperatura ta' inkubazzjoni u medda;
- numru ta' repliki.

Riżultati

- valuri tal-pH fi tmiem it-test;
- id-dejta kollha mkejla miġbura fir-reċipjenti ta' kontroll tas-sustanza kimika tat-test, ta' referenza u ta' inbjank, kif xieraq (eż. pressjoni f'Pa jew millibars) f'forma tabulari;
- inibizzjoni perċentwali fil-fliexken tat-test u ta' referenza, u l-kurvi ta' inibizzjoni/konċentrazzjoni;
- kalkolu tal-valuri EC₅₀, espress bħala mg/l u mg/g;
- produzzjoni tal-gass għal kull gramma ta' hama fi 48 siegħa;
- raġunijiet għal kwalunkwe rifjut tar-riżultati tat-test;
- diskussjonijiet tar-riżultati, inkluż kwalunkwe devjazzjoni mill-proċeduri f'dan il-metodu ta' ttestjar u tiġi diskussa kwalunkwe devjazzjoni fir-riżultati tat-test minhabba l-interferenzi u l-iżbalji minn dak li jkun mistenni;
- jiġi indirizzat ukoll jekk il-fini ta' dan it-test kienx li jkejjel it-tossiċità għal mikro-organismi esposti minn qabel jew mhux esposti minn qabel.

LETTERATURA

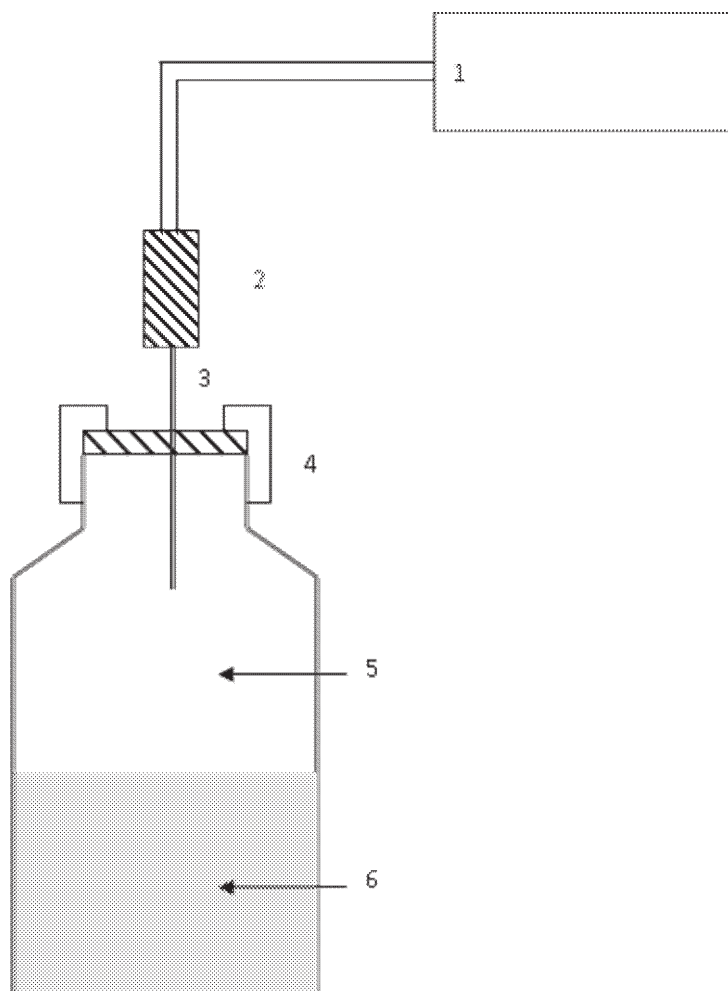
- (1) Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Hama Attivata, Test tal-Inibizzjoni tar-Respirazzjoni.
- (2) Kapitolu C.43 ta' dan l-Anness: Bijodegradabilità anaerobika tal-komposti organiċi fil-hama diġerita: metodu ta' kejl tal-produzzjoni tal-gass.
- (3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.
- (4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼ M6

- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. INT Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).
- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
- (12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 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.
- (13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ **M6***Appendiċi 1*

Eżempju ta' apparat biex titkejjel il-produzzjoni ta' bijogass skont il-perssjoni tal-gass



Spjega:

- 1 — Miter tal-perssjoni
- 2 — valv impermeabbli għall-gass b'żewġ direzzjonijiet jew tridirezzjonali
- 3 — Labra ta' siringa
- 4 — Sigill impermeabbli għall-gass (għatu kkrimpjat u septum)
- 5 — Spazju fil-wiċċ
- 6 — Inokulu ta' ħamrija diġerita

Reċipjenti tat-test f'ambjent ta' $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

▼ **M6***Appendiċi 2***Konverżjoni tal-miter tal-pressjoni**

Il-qari tal-miter tal-pressjoni jista' jkun relatat mal-volumi ta' gass permezz ta' kurva standard u minn dan jista' jiġi kkalkolat il-volum ta' gass prodott għal kull gramma ta' ħama xotta għal 48 siegħa. Dan l-indiċi ta' attività jintuża bħala wiehed mill-kriterji li permezz tiegħu tista' tiġi vvalutata l-validità tar-risultati tat-test. Il-kurva ta' kalibrazzjoni tiġi prodotta bl-injezzjoni ta' volumi magħrufa ta' gass f'35 °C ± 2 °C fi fliexken tas-serum li fihom volum ta' ilma ugwali għal dak tat-tahlita ta' reazzjoni, V_R ;

- Ferra' V_R ml alikwoti ta' ilma, miżmuma f'35 °C ± 2 °C f'ħames fliexken tas-serum. Issigilla l-ilmijiet u qiegħedhom siegħa f'banjumarija 35 °C ± 2 °C sabiex jekwilibraw;
- Ixgħel il-miter tal-pressjoni, hallih jistabbilizza, u aġġusta għal zero;
- Dahħal il-labra tas-siringa fis-sigill ta' wiehed mill-fliexken, iftaħ il-valv sakemm il-miter tal-pressjoni jaqra' zero u aghlaq il-valv;
- Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;
- Injetta 1 ml arja f'35 °C ± 2 °C f'kull fliexkun. Dahħal il-labra (fuq il-miter) mis-sigill ta' wiehed mill-fliexken u halli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza. Irreġistra l-pressjoni, iftaħ il-valv sakemm il-pressjoni taqra' zero u mbagħad aghlaq il-valv;
- Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;
- Irrepeti l-proċedura totali permezz ta' 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml, u 50 ml arja;
- Ipplotta kurva ta' konverżjoni tal-pressjoni (Pa) mal-volum ta' gass injettat (ml). Ir-rispons tal-istrument huwa lineari matul fil-medda 0 Pa sa 70 000 Pa, u 0 ml sa 50 ml ta' produzzjoni tal-gass.

▼ M6

Appendiċi 3

Fatturi identifikati li jistghu jwasslu għal riżultati foloz(a) *Kwalità tat-tappijiet tal-fliexken*

Fis-suq huma disponibbli tipi differenti ta' septa għall-fliexken tas-serum; li ħafna minnhom, inkluża l-gomma tal-butyl, tonqsilhom il-impermeabbiltà meta jittaqqbu b'labra fil-kundizzjonijiet ta' dan it-test. Xi drabi l-pressjoni tinżel bil-mod ħafna, ladarba s-septum jittaqqab bil-labra tas-siringa. Huwa rakkomandat l-użu ta' septa impermeabbli għall-gass biex jiġu evitati tnixxijiet (paragrafu 12(b)).

(b) *Umdità fil-labra tas-siringa*

Kultant takkumula umdià fil-labra tas-siringa u t-tubi, u hija indikata minn qari tal-pressjoni fit negattiv. Biex tirrettifika dan, nehhi l-labra u hawwad it-tubi, nixxef b'karta assorbenti u wahhal labra ġdid (paragrafi 12(c) u 35).

(c) *Kontaminazzjoni tal-ossigenu*

Metodi anaerobiċi huma soġġetti għal żball minn kontaminazzjoni mill-ossigenu, li tista' tikkawża produzzjoni ta' gass iktar baxxa. F'dan il-metodu, din il-possibbiltà għandha titnaqqas bl-użu ta' tekniċi strettament anaerobiċi, inkluż l-użu ta' kompartment tal-ingwanti.

(d) *Sottostrati grossi fil-hama*

Il-produzzjoni ta' gass anaerobiku u s-sensittività tal-hama, huma influwenzati minn sottostrati li huma ttrasferiti mill-inokulu għall-fliexken tat-test. Il-hama diġerita mid-diġesturi anaerobiċi domestiċi xorta wahda ħafna drabi jkun fiha materja rikonoxxibbli bħal xagħar u residwi tal-pjanti ta' ċelluloża, li għandhom tendenza li jagħmluha diffiċli biex jittiehdu kampjuni rappreżentattivi. Billi l-hama tingħadda minn passatur, il-materja grossa li ma tinhallx tista' titneħħa, u dan iżid il-probabbiltà ta' kampjunar rappreżentattiv (paragrafu 16).

(e) *Sustanzi kimiċi tat-test volatili*

Is-sustanzi kimiċi tat-test volatili sejrni jiġu rilaxxati fl-ispazju fil-wicc tal-fliexken tat-test. Dan jista' jirriżulta fit-telf ta' xi parti mill-materjal tat-test mis-sistema matul l-ivventjar wara l-kejl tal-pressjoni, u dan jipproduċi b'mod qarrieqi valuri ta' EC₅₀ għolja. B'għażla xierqa ta' proporzjon ta' volum ta' spazju fil-wiċċ mal-volum likwidu u billi ma jsirx ivventjar wara li jittiehdu l-kejl tal-pressjoni, l-iżball jista' jitnaqqas (10).

(f) *Nuqqas ta' linearità tal-produzzjoni tal-gass*

Jekk il-plott tal-medja kumulattiva ta' produzzjoni tal-gass mal-ħin ta' inkubazzjoni ma tkunx bejn wiehed u iehor lineari matul il-perjodu ta' 48 siegħa, l-eżattezza tat-test tista' titnaqqas. Biex jingheleb dan, huwa rakkomandabbli li tintuża hama ta' diġestjoni minn sors differenti u/jew li tiżdied konċentrazzjoni ikbar tal-brodu tan-nutrijenti u s-sottostrat tat-test, estratt tal-hmira u glukozju (paragrafu 29).

▼ **M6***Appendiċi 4***Applikazzjoni għall-kampjuni ambjentali ta' konċentrazzjoni tal-bijomassa baxxa — tajn anaerobiku, naqal, eċċ.****INTRODUZZJONI**

- A.1 B'mod ġenerali, l-attività mikrobjali speċifika (volum tal-gass prodott għal kull gramma solidi xotti) ta' tajn anaerobiku, naqal, hamriji naturali, eċċ, hija ferm iktar baxxa minn dik ta' hama anaerobika derivata mid-drenaġġ. Minhabba dan, meta jridu jitkejlu l-effetti inibitorji tas-sustanzi kimiċi fuq dawn il-kampjuni inqas attivi, xi whud mill-kundizzjonijiet sperimentali għandhom jiġu mmodifikati. Għal dawn il-kampjuni inqas attivi, hemm żewġ pjanijiet ta' azzjoni ġenerali possibbli:
- (a) Wettaq test preliminari mmodifikat (paragrafu 25) bil-kampjun ta' tajn, hamrija mhux dilwita, eċċ f'35 °C ± 2 °C jew fit-temperatura fl-istess sit tal-kampjun ta' ġbir, għal simulazzjoni iktar peċiża (bħal fil-Parti 1 tal-ISO 13 641);
- (b) Jew wettaq it-test b'hama ta' diġestur dilwita (1 f'100) biex tistimula l-attività baxxa mistennija mill-kampjun tal-ambjent, izda zomm it-temperatura f'35 °C ± 2 °C (bħal fil-Parti 2 tal-ISO 13 641).
- A.2 Opzjoni (a) tista' tintlahaq billi jiġi segwit il-metodu deskritt hawnhekk (ekwivalenti għall-Parti 1 tal-ISO 13 641), izda huwa essenzjali li jsir test preliminari (paragrafu 25) biex jiġu aċċertati l-aqwa kundizzjonijiet, sakemm dawn ma jkunux diġà magħrufin minn ittestjar preċedenti. Il-kampjun ta' hama jew naqal għandu jithawwad sew, eż. fi blender, u, jekk ikun meħtieġ, dilwit bi proporzjon żgħir ta' ilma ta' dilwizzjoni li tnehhitlu l-arja (paragrafu 14) b'tali mod li jkun mobbli biżżejjed biex jiġi ttrasferit minn pipetta b'ponta hoxna jew ċilindru tal-kejl. Jekk jitqies li n-nutrijenti jaf' ikunu neqsin, il-kampjun tal-hama jista' jiġi ċċentrifugat (f'kundizzjonijiet anaerobiċi) u sospiż mill-ġdid fil-midjum minerali li fih l-estratt tal-hmira (A.11).
- A.3 Opzjoni (b). Dan raġonevolment jimita l-attività baxxa ta' kampjuni ambjentali izda jonqsu l-konċentrazzjoni għolja ta' solidi sospiżi li jinsabu f'dawn il-kampjuni. Ir-rwol ta' dawn is-solidi fl-inibizzjoni mhuwiex magħruf, izda huwa possibbli li r-reazzjoni bejn is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kostitwenti tat-tajn, kif ukoll l-adsorbiment tas-sustanzi kimiċi tat-test fis-solidi, jirriżultaw fi tnaqqis tat-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test.
- A.4 It-temperatura hija fattur importanti iehor: għal simulazzjoni stretta, għandhom isiru testijiet fit-temperatura tas-sit tal-kampjun, peress li gruppi differenti ta' konsorzji ta' batterji li jipproduċu l-metan huma magħrufa li joperaw f'mediet ta' temperatura differenti, jiġifieri termofili (~ 30-35 °C), mesofili (20-25 °C) u psikrofili (< 20 °C), li jistgħu jesebixxu mudelli inibitorji differenti.
- A.5 Durata. Fit-test ġenerali, Parti 1, permezz ta' hama mhux dilwita, il-produzzjoni ta' gass fil-jiem 2-4 dejjem kienet biżżejjed, filwaqt li fil-Parti 2 b'hama dilwita f'mitt parti, ma ġiex prodott biżżejjed gass jew ma ġiex prodott ebda gass, f'dan il-perjodu fir-ring test. Madsen et al (1996), fid-deskrizzjoni ta' dan l-aħhar test, jgħidu li tal-inqas għandhom jithallew 7 jiem.

Ittestjar b'konċentrazzjoni ta' bijomassa baxxa (Opzjoni b)

Għandhom isiru l-bidliet u l-emendi li ġejjin, li jzidu jew inaqqsu xi paragrafi u sottoparagrafi eżistenti tat-test ewlieni.

▼M6

A.6 Żid ma' Paragrafu 6: Prinċipju tat-test;

“Din it-teknika tista' tintuża b'hama anaerobika dilwita f'mitt parti, parzjalment biex tistimula l-attività baxxa tat-tajn u n-naqal. It-temperatura ta' inkubazzjoni tista' tkun 35 °C jew dik tas-sit minn fejn ingabar il-kampjun. Peress li l-attività batterjali hija ferm iktar baxxa fil-hama mhux dilwita, il-perjodu ta' inkubazzjoni għandu jiġi estiz għal tal-inqas 7 ijiem.”

A.7 Żid ma' paragrafu 12 (a):

“l-inkubatur għandu jkun kapaċi jopera f'temperaturi ta' 15 °C.”

A.8 Żid reagent żejjed wara l-Paragrafu 13:

“Aċidu fosforiku (H_3PO_4), 85 % b'massa fl-ilma.”

A.9 Żid fi tmiem il-Paragrafu 16:

“Uża konċentrazzjoni finali ta' $0,20 \pm 0,05$ g/l mit-total ta' solidi xotti fit-test.”

A.10 Paragrafu 17. Sottostrat tat-test

Dan is-sottostrat ma għandux jintuża, iżda huwa sostitwit minn estratt tal-ħmira (ara l-paragrafi 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 Huwa mehtieg midjum minerali, inkluzi elementi ta' frak, għad-dilwizzjoni ta' hama anaerobika, u għal konvenjenza, is-sottostrat organiku, l-estratt tal-ħmira, jizdied ma' dan il-midjum.

Żid wara Paragrafu 17

“(a) Midjum minerali tat-test, b'estratt tal-ħmira.

Dan huwa ppreparat minn midjum tat-test ikkonċentrat għal 10 darbiet (paragrafu 17(b); A.12) b'soluzzjoni ta' element tal-frak (paragrafu 17(c); A.13). Uża nonaidrat tas-sulfur tas-sodju li jkun għadu kif ġie fornit (il-paragrafu 17(b); A.12) jew aħslu u nixxfu qabel l-użu, biex tiżgura li għandu kapaċità ta' tnaqqis suffiċjenti. Jekk it-test jitwettagħ mingħajr l-użu ta' kompartment tal-ingwanti (paragrafu 12(j)), il-konċentrazzjoni ta' sulfur tas-sodju fis-soluzzjoni ewlenija għandha tiżdied għal 2 g/l (minn 1 g/l). Sodium sulphide jista' jizdied ukoll minn soluzzjoni ewlenija xierqa mis-septum tal-fliexken tat-test magħluqa, peress li din il-proċedura sejra tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni, biex tikseb konċentrazzjoni finali ta' 0,2 g/l. Inkella jista' jintuża ċ-ċitrat tat-titanju (III) (paragrafu 17(b)). Żidu mis-septum tal-fliexken tat-test magħluqa biex tikseb konċentrazzjoni ta' 0,8 mmol/l sa 1,0 mmol/l. Iċ-ċitrat tat-titanju (III) huwa aġent riduċenti effikaċi hafna u b'tossicità baxxa, li jiġi ppreparat kif ġej: Holl 2,94 g diidrat taċ-ċitrat tat-trisodju f'50 ml ilma tad-dilwizzjoni mingħajr ossiġenu (paragrafu 14) (li jirrizulta f'soluzzjoni ta' 200 mmol/l) u žid 5 ml ta' soluzzjoni klorur tat-titanju (III) (ilma ta' dilwizzjoni ta' 15 g/100 ml) Innewtralizza għal pH $7 \pm 0,5$ b'karbonat tas-sodju u ferra' ġo flixxun tas-serum xieraq taht fluss ta' gass tan-nitroġenu. Il-konċentrazzjoni taċ-ċitrat tat-titanju (III) f'din is-soluzzjoni ewlenija hija ta' 164 mmol/l. Uża l-midjum tat-test mill-ewwel jew aħžen f'4 °C għal mhux iktar minn jum.

A.12 (b) Midjum tat-test ikkonċentrat għal għaxar darbiet, ippreparat b'dan li ġej:

anhydrous potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	2,7 g
Fosfat tal-idroġenu tad-disodju (Na_2HPO_4)	4,4 g
(jew 11,2 g dodekaidrat)	5,3 g
ammonium chloride (NH_4Cl)	

▼ **M6**

klorur tal-kalċju diidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
essaidrat tal-klorur tal-manjeżju ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
tetraidrat (II) tal-klorur tal-hadid ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
resażurina (indikatur tar-redox)	0,01 g
nonaidrat tas-sulfur tas-sodju ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(jew (III) ċitrat tat-titanju) konċentrazzjoni finali	0,8 mmol/l sa 1,0 mmol/l
soluzzjoni ta' mikroelement (ara l-paragrafu 17 (c); A.13)	10,0 ml
estratt tal-hmira	100 g
Holl filma tad-dilwizzjoni (paragrafu 14) u imla sa:	1 000 ml

A.13 (c) Soluzzjoni ta' mikroelement, ippreparata b'dawn li ġejjin:

tetraidrat (II) tal-klorur tal-hadid ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
aċidu orto-boriku (H_3BO_3)	0,05 g
klorur taż-żingu (ZnCl_2)	0,05 g
(II) klorur tar-ram (CuCl_2)	0,03 g
diidrat tal-molibdat tas-sodju ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
(II) essaidrat tal-klorur tal-kobalt ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(II) essaidrat tal-klorur tal-nikil ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
disodium selenite (Na_2SeO_3)	0,05 g
Holl filma tad-dilwizzjoni (paragrafu 14) u imla sa:	1 000 ml

A.14 Paragrafu 25: Test preliminari

Huwa essenzjali li jsir test preliminari kif deskritt fil-paragrafu 24, hlief li l-konċentrazzjoni ta' solidi tal-hama għandha tkun mitt darba iżgħar minn ta' dawk mogħtija, li huma 0,1 g/l, 0,2 g/l u 0,4 g/l. Id-durata tal-inkubazzjoni għandha tkun tal-inqas ta' 7 ijiem.

Nota: Fir-ring test (5) il-volum ta' spazju fil-wiċċ kien ferm oghla f'volum totali ta' 75 %; dan għandu jkun fil-medda rakkomandata ta' 10 %-40 %. Il-kriterju rilevanti huwa dak li l-volum ta' gass prodott finibizzjoni ta' madwar 80 % għandu jkun jista' jitkejjel bi preċiżjoni aċċettabbli (eż. $\pm 5\%$ sa $\pm 10\%$).

A.15 Paragrafu 26 sa 30: Żieda ta' sustanza kimika tat-test, inokulu u sottostrat.

Iż-żidiet isiru bl-istess mod kif deskritt f'dawn il-paragrafi, iżda s-soluzzjoni tas-sottostrat (paragrafu 17) tiġi ssostitwita bil-midjum tat-test flimkien ma' sottostrat ta' estratt tal-hmira (A.11).

Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni finali ta' solidi ta' hama xotta titnaqqas minn 2 g/l — 4 g/l sa $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9). Żewġ eżempji ta' zieda ta' komponenti mat-tahlita tat-test jingħataw fit-Tabellla A.1, li tiegħu post it-tabella fil-paragrafu 29.

A.16 Paragrafu 33: Inkubazzjoni tal-fliexken

Minhabba r-rata iktar baxxa mistennija ta' produzzjoni tal-gass, l-inkubazzjoni ssir għal tal-inqas 7 ijiem.

▼ **M6**

A.17 Paragrafu 34: Kejljet tal-pressjoni

L-istess proċedura għall-kejl tal-pressjoni fl-ispazju fil-wiċċ tal-fliexken tintuża kif deskritt fil-paragrafu 34, jekk ikunu meħtieġa l-ammonti fil-fażi gassuża. Jekk għandhom jitkejlu l-ammonti totali ta' CO₂ flimkien ma' CH₄, il-pH tal-fażi likwida jitnaqqas għal madwar pH 2 bl-injezzjoni ta' H₃PO₄ f'kull fliexkun rilevanti u l-kejl tal-pressjoni wara li jithawwad għal madwar 30 minuta fit-temperatura tat-test. Madankollu, tista' tinkiseb iktar informazzjoni dwar il-kwalità tal-inokulu billi titkejjel il-pressjoni f'kull fliexkun qabel u wara l-aċidifikazzjoni. Pereżempju, meta r-rata ta' produzzjoni ta' CO₂ tkun ferm oghla minn dik tal-metan, is-sensittività tal-batterji fermentattivi tista' tinbidel u/jew il-batterji metanoġeniċi huma preferenzjalment affettwati mis-sustanza kimika tat-test.

A.18 Paragrafu 36: kejl tal-pH

Jekk sejjer jintuża H₃PO₄, għandhom jiġu kkonfigurati xi fliexken żejda, li magħhom ma għandu jiżdied ebda H₃PO₄, speċjalment għall-kejl tal-pH.

REFERENZA:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tablella A.1.

Eżempji tal-konfigurazzjoni tat-test għal-lottijiet tat-test

Kostitwenti tat-Tahlita ta' Reazzjoni	Eżempju 1	Eżempju 2	Ordni normali taż-żieda
Konċentrazzjoni tal-inokulu ppreparat (g/l)	0,42	2,1	—
Volum tal-inokulu miżjud (ml)	45	9	4
Konċentrazzjoni tal-inokulu fil-fliexken tat-test (g/l)	0,20	0,20	—
Volum tal-midjum tat-test miżjud (ml)	9	9	2
Volum tal-ilma ta' dilwizzjoni miżjud (ml)	36	72	3
Konċentrazzjoni tal-estratt tal-ħmira fil-fliexken tat-test (g/l)	9,7	9,7	—
Volum tas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (ml)	3	3	1
Volum totali tal-likwidu (ml)	93	93	—

▼ **M6**

Appendiċi 5

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

Sustanza kimika tal-ittestjar tfisser kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼M6

C.35. TEST TAT-TOSSIĊITÀ *LUMBRICULUS* TAN-NAQAL/ILMA PERMEZZ TA' NAQAL MIŻJUD

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ittestjar (TG) 225 tal-OECD (2007). Annimali endobentiċi li jieklu n-naqal huma soġġetti għal espożizzjoni potenzjalment għolja għal sustanzi kimiċi mwahhla man-naqal u għalhekk għandhom jinghataw attenzjoni preferenzjali, eż. (1), (2), (3). Fost dawn l-ingesturi tan-naqal, l-oligoċaeti akkwatiċi għandhom rwol importanti fin-naqal tas-sistemi akkwatiċi. Permezz ta' bijoturbazzjoni tan-naqal u billi jservu bħala priża, dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza qawwija fuq il-bijodisponibbiltà ta' dawn is-sustanzi kimiċi għal organiżmi oħra, eż. hut bentivoruż. Għall-kuntrarju ta' organiżmi epibentiċi, l-oligoċaeti akkwatiċi andobentiċi (eż. *Lumbriculus variegatus*) iħaffru fin-naqal, u jieklu frak tan-naqal taht wiċċ in-naqal. Dan jiżgura espożizzjoni tal-organiżmi tat-test għas-sustanza kimika tat-test permezz tar-rotot ta' tehid possibbli kollha (eż. kuntatt ma', u ingestjoni ta' frak tan-naqal kontaminat, iżda anki permezz tal-ilma interstizjali u l-ilma tal-madwar).
2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiffassal biex jivvaluta l-effetti ta' espożizzjoni mtawla tal-oligoċaeti endobentiċi *Lumbriculus variegatus* (Müller) għal sustanzi kimiċi assoċjati man-naqal. Huwa bbażat fuq il-protokolli tat-test tal-bijoakkumulazzjoni u t-tossiċità tan-naqal eżistenti, eż. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Il-metodu huwa deskritt għal kundizzjonijiet tat-test statiki. Ix-xenarju ta' espożizzjoni użat f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa ż-żieda tan-naqal mas-sustanza kimika tat-test. L-użu ta' naqal miżjud huwa mahsub li jistimula naqal ikkontaminat b'sustanza kimika tat-test.
3. Is-sustanzi kimiċi li jehtieg li jiġu ttestjati għal organiżmi li jgħixu fin-naqal ġeneralment jippersistu f'dan il-kompartiment fuq perjodi ta' żmien twal. L-organiżmi li jgħixu f'dan in-naqal jistgħu jiġu esposti permezz ta' diversi rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni, u l-hin li jittiehed għal kull wahda minnhom biex tikkontribwixxi għall-effetti tossiċi globali, tiddependi fuq il-proprjetajiet fizikokimiċi tas-sustanza kimika kkonċernata u d-destin finali tagħha fl-annimal. Għal sustanzi kimiċi adsorbenti hafna (eż. $\log K_{ow} > 5$) jew għal sustanzi kimiċi li jehlu b'mod kovalenti man-naqal, l-ingestjoni ta' ikel ikkontaminat jista' jkun rotta ta' espożizzjoni sinifikanti. Sabiex ma tiġix sottovalutata t-tossiċità ta' tali sustanzi kimiċi, l-ikel mehtieg għar-riproduzzjoni u t-tkabbir tal-organiżmi tal-ittestjar jiżdied man-naqal qabel l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (11). Il-metodu ta' ttestjar deskritt huwa ddettaljat biżżejjed biex ikun jista' jitwettag it-test, filwaqt li jippermetti adattamenti fid-disinn sperimentali skont il-kundizzjonijiet fl-laboratorji partikolari u d-diversi karatteristiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test.
4. Il-metodu ta' ttestjar għandu l-għan li jistabbilixxi l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq ir-riproduzzjoni u l-bijomassa tal-organiżmi tat-test. Il-parametri bijoloġiċi mkejla huma n-numru totali ta' dud li baqa' ħaj u l-bijomassa (piż xott) fi tmiem l-espożizzjoni. Din id-dejta tiġi analizzata permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-koncentrazzjoni li tikkawża effett ta' x % (eż. EC₅₀, EC₂₅, u EC₁₀), jew permezz ta' ipoteżi statistika bix tiġi ddeterminata l-Koncentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) u l-Koncentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC).
5. Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, "Test tat-tossiċità kironomid tan-naqal/ilma permezz ta' naqal miżjud" (6), ipprova hafna dettalji essenzjali u utli għat-twettag tal-metodu ta' ttestjar tat-tossiċità tan-naqal ipprezentat. Għalhekk, dan id-dokument iservi bħala bażi li permezz tiegħu twettqu l-modifiki mehtieġa għat-twettag tat-testijiet tat-tossiċità tan-naqal b'*Lumbriculus variegatus*. Dokumenti oħra li ssir referenza għalihom huma eż. il-Gwida Standard tal-ASTM għad-Determinazzjoni tal-Bijoakkumulazzjoni tal-Kontaminanti Assoċjati man-Naqal minn Invertebrati Bentiċi (3), il-Metodi tal-EPA

▼ **M6**

tal-Istati Uniti għall-Kejl tat-Tossicità u l-Bijoakkumulazzjoni ta' Kontaminanti Assoċjati man-Naqal b'Invertebrati tal-Ilma Helu (7), u l-Gwida Standard tal-ASTM għall-Ġbir, il-Hażna, il-Karatterizzazzjoni, u l-Manipulazzjoni tan-Naqal għall-Ittestjar Tossikoloġiku u għall-ghażla ta' kampjuni użati biex jingabru l-invertebrati bentiċi (12). Barra minn hekk, l-esperjenza Prattika miksuba matul ir-ring testing tal-metodu ta' ttestjar ((13), ir-rapport dwar ir-ring test), u d-dettalji mid-dokumentazzjoni huma sorsi ewlenin ta' informazzjoni għat-tfassil ta' dan id-dokument.

PREREKWIŻIT U INFORMAZZJONI TA' GWIDA

6. Għandha tinkiseb informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test bħal prekawzzjonijiet dwar is-sigurtà, kundizzjonijiet ta' ħżin xierqa u metodi analitiċi qabel ma jinbada l-istudju. F'(14) hija pprovduta gwida għas-sustanzi kimiċi tat-test bi proprjetajiet fiżikokimiċi li jagħmluhom diffiċli biex jitwettaq it-test.
7. Qabel ma jitwettaq test, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza kimika tat-test:
 - isem komuni, isem tas-sustanza kimika (preferibbilment isem IUPAC), formola strutturali, numru tar-registru CAS, purità;
 - il-pressjoni tal-fwar;
 - solubbiltà fl-ilma.
8. L-informazzjoni addizzjonali li ġejja hija kkunsidrata utli qabel ma jinbada t-test:
 - koeffiċjent tal-partizzjoni ottanol-ilma, K_{ow} ;
 - koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju/ilma organiku, espress bħala K_{oc} ;
 - idrolizi;
 - fototrasformazzjoni fl-ilma;
 - bijodegradabbiltà;
 - tensjoni tal-wiċċ.
9. Għandha tinkiseb informazzjoni dwar ċerti karatteristiċi tan-naqal li sejjer jintuża qabel ma jinbada t-test (7). Għal dettalji ara l-paragrafi 22 sa 25.

PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Dud bi stat fiżjoloġiku simili (sinkronizzat kif deskritt fl-Appendiċi 5) huwa espost għal serje ta' konċentrazzjonijiet tossikanti applikati għall-faži tan-naqal ta' sistema tan-naqal/ilma. Bħala midjums għandhom jintużaw naqal artifiċjali u ilma rikostitwit. Ir-reċipjenti tat-test mingħajr iż-żieda tas-sustanzi kimiċi tat-test jservu bħala kontrolli. Is-sustanza kimika tat-test tiżdied man-naqal b'mod aggregat għal kull livell ta' konċentrazzjoni sabiex titnaqqas il-varjabbiltà bejn ir-repliki ta' kull livell ta' konċentrazzjoni, u l-organizmi tat-test imbagħad jiġu introdotti fir-reċipjenti tat-test fejn ġew ekwilibrati n-naqal u l-konċentrazzjonijiet tal-ilma (ara l-paragrafu 29). L-annimali tat-test jiġu esposti għas-sistemi tan-naqal/ilma għal perjodu ta' 28 jum. Fid-dawl tal-kontenut baxx ta' nutrijenti tan-naqal artifiċjali, in-naqal għandu jiġi emendat b'sors ta' ikel (ara l-paragrafi 22 sa 23, u l-Appendiċi 4) biex jiġi żgurat li d-dud jikber u jirriproduċi ruħu f'kundizzjonijiet ta' kontroll. B'dan il-mod huwa żgurat li l-annimali tat-test jiġu esposti tul l-ilma u n-naqal kollu kif ukoll mill-ikel tagħhom.
11. Il-punt ta' tmiem ippreferut ta' dan it-tip ta' studju huwa EC_x (eż. EC_{50} , EC_{25} , u EC_{10} ; il-konċentrazzjoni tal-effett, li taffettwa x % tal-organizmi tat-test) għar-riproduzzjoni u l-bijomassa, rispettivament, meta mqabbel mal-kontroll. Madankollu, ta' min jinnota li fid-dawl tal-inċertezza qawwiya ta' EC_x baxxa (eż. EC_{10} , EC_{25}) b'limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għoljin hafna

▼ **M6**

(eż. (15)) u s-setgħa statistika kkalkolata matul l-ittestjar tal-ipoteżi, l-EC₅₀ titqies il-punt ta' tmiem l-iktar b'saħħtu. Barra minn hekk, tista' tiġi kkalkolata l-Koncentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC), u l-Koncentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) għall-bijomassa, u r-riproduzzjoni, jekk id-disinn tat-test u d-dejta jappoġġjaw dawn il-kalkoli (ara l-paragrafi 34 sa 38). Il-fini tal-istudju, l-EC_x jew id-derivazzjoni tal-NOEC, se jrid jiddeterminaw id-disinn tat-test.

ITTESTJAR TA' REFERENZA

12. Il-prestazzjoni tal-organizmi ta' kontroll hija mistennija li turi b'mod suffiċjenti l-kapaċità ta' laboratorju li jwettaq it-test, u jekk tkun disponibbli dejta storika, ir-repetibbiltà tat-test. Barra minn hekk, jistgħu jitwettqu testijiet ta' referenza tat-tossiċità f'intervalli regolari permezz ta' tossikanti ta' referenza biex tiġi vvalutata s-sensittività tal-organizmi tat-test. Testijiet tat-tossiċità ta' referenza ta' 96 siegħa fl-ilma biss jistgħu juru b'mod sodisfaċenti, is-sensittività u l-kundizzjoni tal-annimali tat-test (4)(7). Informazzjoni dwar it-tossiċità tal-pentaklorofenol (PCP) f'testijiet kompluti (espożizzjoni ta' 28 jum għal naqal miżjud) hija inklusa fl-Appendiċi 6, u fir-rapport dwar ir-ring test tal-Metodu ta' Ttestjar (13). It-tossiċità akuta, fl-ilma biss tal-PCP hija deskritta eż. f'(16). Din l-informazzjoni tista' tintuża għal paragon tas-sensittività tal-organizmu tat-test f'testijiet ta' referenza b'PCP bħala t-tossikant ta' referenza. Il-klorur tal-potassju (KCl) jew is-sulfat tar-ram (CuSO₄) ġew rakkomandati bħala t-tossikanti ta' referenza b'*L. variegatus* (4)(7). S'issa, l-istabiliment ta' kriterji tal-kwalità abbażi tat-tossiċità tad-dejta għall-KCl huwa diffiċli minhabba n-nuqqas ta' dejta mid-dokumentazzjoni għal *L. variegatus*. Informazzjoni dwar it-tossiċità tar-ram għal *L. variegatus* tista' tinstab f'(17) sa (21).

VALIDITÀ TAT-TEST

13. Għal test biex ikun validu, għandhom jiġu ssodisfati r-rekwiżiti li ġejjin:
 - Ring test (13) wera li għal *Lumbriculus variegatus*, in-numru medju ta' dud li baqa' ħaj għal kull replikat fil-kontrolli kellu jiżdied b'fattur ta' mill-inqas 1,8 fi tmiem l-espożizzjoni meta mqabbel man-numru ta' dud għal kull replikat fil-bidu tal-espożizzjoni.
 - Il-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun bejn 6 u 9 matul it-test kollu.
 - Il-koncentrazzjoni ta' ossiġenu fl-ilma tal-madwar ma għandhiex tkun ta' inqas minn 30 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV) fit-temperatura tat-test matul it-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TAT-TEST**Sistema tat-test**

14. Huma rakkomandati sistemi statiči mingħajr tiġdid tal-ilma tal-madwar. Jekk il-proporzjon ta' naqal/ilma (ara l-paragrafu 15) huwa xieraq, arjazzjoni bil-mod se jrid tkun normalment biżżejjed biex iżzomm il-kwalità tal-ilma fl-livelli aċċettabbli għall-organizmi tat-test (eż. jiġu massimizzati l-livelli ta' ossiġenu mahlula, tiġi minimizzata l-akkumulazzjoni ta' prodotti eskritorjali). Sistemi semistatichi jew bi fluss kontinwu b'tiġdid intermittenti jew kontinwu tal-ilma tal-madwar għandhom jintużaw biss f'każijiet eċċezzjonali, peress li t-tiġdid regolari tal-ilma tal-madwar huwa mistenni li jaffettwa l-ekwilibriju tas-sustanza kimika (eż. telfiet tas-sustanza kimika tat-test mis-sistema tat-test).

Reċipjenti u apparat tat-test

15. L-espożizzjoni għandha ssir f'bekkijiet tal-ħġieġ ta' eż. 250 ml li għandhom dijametru ta' 6 cm. Jistgħu jintużaw ukoll reċipjenti tal-ħġieġ xierqa oħra, iżda dawn għandhom jiggarrantixxu fond xieraq tal-ilma tal-madwar u n-naqal. Kull reċipjent għandu jirċievi saff ta' madwar 1,5 — 3 cm ta' naqal formulat. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal mas-saff tal-ilma

▼ M6

tal-madwar għandu jkun ta' 1:4. Ir-reċipjenti għandhom ikunu ta' kapacità xierqa f'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri n-numru ta' dud tat-test miżjud ma' kull unità ta' ppeżar tan-naqal, (ara wkoll il-paragrafu 39).

16. Ir-reċipjenti tat-test u apparat ieħor li sejrjn jiġu f'kuntatt mas-sustanzi kimiċi tat-test għandhom ikunu magħmula kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament inert i eħor. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' materjali, għall-partijiet kollha tat-tagħmir li jistgħu jhollu, jadsorbu s-sustanzi kimiċi tat-test jew jiffiltraw sustanzi kimiċi oħrajn u jkollhom effett avvers fuq l-annimali tat-test. Għandu jintuża politetrafluoroetilen (PTFE), azzar inossidabbli u/jew ħġieġ għal kwalunkwe tagħmir li jkollu kuntatt mal-midjums tat-test. Għal sustanzi kimiċi organiċi magħrufa li jadsorbu mal-ħġieġ, jaf ikun meħtieġ ħġieġ silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir sejjer ikollu jintrema wara l-użu.

Speċijiet tat-test

17. L-ispeċi tal-ittestjar uzata f'dan it-tip ta' studju hija l-oligoċaeta tal-ilma helu *Lumbriculus variegatus* (Müller). Din l-ispeċi tiflaħ għal firxa wiesgħa ta' tipi ta' naqal, u tintuża hafna għat-tossicità tan-naqal u l-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni [eż. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Għandu jiġi rrapportat l-orijini tal-annimali tat-test, il-konferma tal-identità tal-ispeċijiet (eż. (36)) kif ukoll il-kundizzjonijiet tal-kultura. L-identifikazzjoni tal-ispeċi mhijiex meħtieġa qabel kull test, jekk l-organizmi jkunu ġejjin minn kultura domestika.

Kulturi tal-organizmi tat-test

18. Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' dud għat-tweqqif tat-testijiet tat-tossicità tan-naqal, huwa utli li d-dud jinżamm f'kultura tal-laboratorju permanenti. Il-gwida għall-metodi tal-kulturi tal-laboratorju għal *Lumbriculus variegatus*, u s-sorsi ta' kulturi li jibdwu il-fermentazzjoni jingħataw fl-Appendiċi 5. Għal dettalji dwar il-kulturi ta' din l-ispeċi, ara r-referenzi (3), (7), (27).
19. Biex jiġi żgurat li t-testijiet jitwettqu b'annimali tal-istess speċi, huwa rakkomandat hafna l-istabbiliment ta' kulturi tal-ispeċi uniċi. Assigura li l-kulturi u speċjalment id-dud użat fit-testijiet ma għandhom ebda mard u anormalitajiet osservabbli.

Ilma

20. Huwa rakkomandat ilma rikostitwit skont il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness (37) għall-użu bħala ilma tal-madwar fit-testijiet; jista' jintuża wkoll għall-kulturi fil-laboratorju tad-dud (ara l-Appendiċi 2 għall-preparazzjonijiet). Jekk ikun meħtieġ, jista' jintuża ilma naturali. L-ilma magħżul għandu jkun ta' kwalità li sejjer jippermetti t-tkabbir u r-riproduzzjoni tal-ispeċi tat-test għal matul il-perjodi ta' akklimatizzazzjoni u ttestjar mingħajr ebda dehra jew imġiba anormali. *Lumbriculus variegatus* intwera li jibqa' ħaj, jikber, u jirriproduċi f'dan it-tip ta' ilma (30), u hija pprovduta standardizzazzjoni massima tal-kundizzjonijiet tat-test u l-kulturi. Jekk jintuża ilma rikostitwit, il-kompożizzjoni tiegħu għandha tiġi rrapportata, u l-ilma għandu jiġi kkaratterizzat qabel l-użu tal-inqas mill-pH, il-kontenut ta' ossiġenu, u l-ebusija (espressi bħala mg CaCO₃/l). Analizi tal-ilma għall-mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu jaf tipprovdi informazzjoni utli (ara eż. Appendiċi 3).
21. Il-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun fil-medda bejn 6,0 sa 9,0 (ara l-paragrafu 13). Jekk tkun mistennija żieda fl-iżvilupp tal-ammonja, huwa kkunsidrat utli li l-pH jinżamm bejn 6,0 u 8,0. Għall-ittestjar ta' eż. aċidi organiċi dgħajfa, huwa rakkomandabbli li l-pH jiġi aġġustat bl-ilqugh tal-ilma li għandu jintuża fit-test, kif deskritt eż. f'(16). L-ebusija totali tal-ilma li għandu jintuża fit-test għandha tkun bejn 90 u 300 mg CaCO₃ għal kull litru għall-ilma naturali. L-Appendiċi 3 jiġbor fil-qosor il-kriterji addizzjonali għal ilma tad-dilwizzjoni aċċettabbli skont il-Linja Gwida tal-OECD Nru. 210 (38).

▼ M6

Naqal

22. Peress li naqal naturali mhux ikkontaminat minn daqs tal-frak jaf ma jkunx disponibbli matul is-sena kollha, u organiżmi indigeni kif ukoll il-preżenza ta' mikrosustanzi li jniġġsu jistgħu jinfluwenzaw it-test, għandu preferibbilment jintuża naqal ifformulat (imsejjah ukoll sendiment rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). L-użu ta' naqal formulat inaqqas il-varjabbiltà tal-kundizzjonijiet tat-test kif ukoll l-introduzzjoni ta' fawna indigena. In-naqal formulat li għej huwa bbażat fuq in-naqal artifiċjali skont (6), (39) u (40). Huwa rakkomandat għall-użu f'dan it-tip ta' test ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):
- (a) 4-5 % (piż xott) ta' pit ta' sfanju; huwa importanti li l-pit jintuża f'forma ta' trab, bi grad ta' dekompożizzjoni: "midjum", mithun irqiq (daqs tal-frak $\leq 0,5$ mm), u mnixxef biss bl-arja.
 - (b) 20 ± 1 % (piż xott) tafal tal-kawlina (kontenut ta' kawlinite preferibbilment ta' iktar minn 30 %).
 - (c) 75-76 % (piż xott) ramel kwarzuz (ramel irqiq, daqs tal-frak: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-frak għandu jkun fil-medda ta' 50-200 μm).
 - (d) Ilma dejonizzat, 30–50 % tal-piż xott tan-naqal, flimkien mal-komponenti ta' naqal xott.
 - (e) Jizdied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura (CaCO_3) sabiex jiġi aġġustat il-pH tat-tahlita finali tan-naqal.
 - (f) Il-kontenut ta' karbonju organiku totali (TOC) tat-tahlita finali għandu jkun 2 % ($\pm 0,5$ %) tal-piż xott tan-naqal u għandu jiġi aġġustat permezz ta' ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).
 - (g) L-ikel, eż. weraq f'forma ta' trab ta' Hurrieq (*Urtica* sp., skont l-istandards farmaċewtiċi, għall-konsum mill-bniedem), jew tahlita ta' weraq f'forma ta' trab ta' *Urtica* sp. b'alfaċelluloża (1:1), f0,4 — 0,5 % tal-piż xott tan-naqal, flimkien mal-komponenti tan-naqal xott; għal dettalji ara l-Appendiċi 4.
23. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina, il-materjal tal-ikel, u r-ramel għandhom ikunu magħrufa. Minbarra l-punt g), Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness (6) jelenka materjali tal-pjanti alternattivi li għandhom jintużaw bħala sors ta' nutrijenti: weraq deidratati taċ-ċawls (*Morus alba*), silla bajda (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*), jew ħaxix taċ-ċereali.
24. Is-sors ta' ikel magħżul għandu jizdied qabel jew matul iż-żieda tan-naqal bis-sustanza kimika tat-test. Is-sors ta' ikel magħżul għandu jippermetti għal tal-inqas riproduzzjoni aċċettabbli fil-kontrolli. Analizi tan-naqal artifiċjali jew il-kostitwenti tiegħu għal mikrosustanzi li jniġġsu qabel l-użu, tista' ttiprovdi informazzjoni utli. Eżempju għall-preparazzjoni tan-naqal formulat huwa deskritt fl-Appendiċi 4. It-tahlit ta' kostitwenti xotta huwa aċċettabbli wkoll jekk jintwera li wara ż-żieda tal-ilma tal-madwar, ma ssehhx separazzjoni tal-kostitwenti tan-naqal (eż. iż-żamma fil-wieċ ta' frak tal-pit), u li l-pit jew in-naqal huwa suffiċjentement kundizzjonat (ara wkoll il-paragrafu 25 u l-Appendiċi 4). In-naqal artifiċjali għandu jkun ikkaratterizzat b'tal-inqas mill-orijini tal-kostitwenti, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-frak (ir-ramel perċentwali, il-hama, u t-tafal), il-kontenut totali tal-karbonju organiku (TOC), il-kontenut ta' ilma, u l-pH. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox huwa fakultattiv.
25. Jekk ikun meħtieġ, eż. għal finijiet ta' ttestjar speċifiku, in-naqal naturali minn siti mhux imniġġsa jaf iservi wkoll bħala naqal tat-test u/jew tal-kulturi (3). Madankollu, jekk jintuża naqal naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat b'tal-inqas mill-orijini (sit ta' kollezzjoni), il-pH u l-ammonja tal-ilma intersizjali, il-kontenut ta' karbonju organiku totali (TOC) u l-kontenut ta' nitroġenu, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-frak (ramel perċentwali, hama, u tafal)

▼ M6

kontenut ta' ilma perċentwali (7), u ma għandu jkollu ebda kontaminazzjoni u organiżmi oħra li jistgħu jikkompetu magħhom, jew jikkaċċjaw għall-organiżmi tat-test. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox u l-kapaċità tal-iskambju katjoniku huwa fakultattiv. Huwa rakkomandat ukoll li, qabel jiżdied bis-sustanza kimika tat-test, in-naqal naturali jkun soġġett għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jkunu jeżistu fit-test sussegwenti. Fi tmien dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema.

26. In-naqal li għandu jintuża għandu jkun ta' kwalità li sejjer jippermetti s-sopravivenza u r-riproduzzjoni tal-organiżmi ta' kontrolli għad-durata tal-perjodu ta' espożizzjoni mingħajr ma tintwera ebda dehra jew imġiba anormali. Iz-żewġ dud għandhom iħaffru fin-naqal, u għandhom jieklu n-naqal. Ir-riproduzzjoni fil-kontrolli għandha tal-inqas tkun skont il-kriterju ta' validità kif deskritt fil-paragrafu 13. Il-preżenza jew in-nuqqas ta' gerbub tal-ippurgar fuq wiċċ in-naqal, li tindika ingestjoni tan-naqal mid-dud, għandha tiġi rreġistrata u tista' tkun utli għall-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test firrigward tal-mogħdijiet ta' espożizzjoni. Informazzjoni addizzjonali dwar l-ingestjoni tan-naqal tista' tinkiseb permezz tal-metodi deskritti f'(24), (25), (44), u (45), li jispeċifikaw l-ingestjoni tan-naqal jew l-għażla tal-frak fl-organiżmi tat-test.
27. Il-proċeduri ta' manipolazzjoni għan-naqal naturali qabel l-użu fil-laboratorju huma deskritti f'(3), (7), u (12). Il-preparazzjoni u l-ħżin tan-naqal artifiċjali li huwa rakkomandat li jintuża fit-test ta' *Lumbriculus* huma deskritti fl-Appendiċi 4.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test

28. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiżdied man-naqal. Peress li l-biċċa l-kbira tas-sustanzi kimiċi tat-test huma mistennija jkollhom solubbiltà baxxa fl-ilma, dawn għandhom jinhallu f'solvent organiku xieraq eż. aċetun, n-essan, ċikloessan) f'volum żgħir kemm jista' jkun sabiex tiġi ppreparata s-soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija għandha tithallat mal-istess solvent biex jiġu ppreparati s-soluzzjonijiet tat-test. It-tossiċità u l-volatilità tas-solvent, u s-solubbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin għall-għażla ta' aġent solubilizzanti xieraq. Għal kull livell ta' konċentrazzjoni, għandu jintuża l-istess volum ta' soluzzjoni korrispondenti. In-naqal għandu jiżdied b'mod aggregat għal kull livell ta' konċentrazzjoni sabiex titnaqqas il-varjabbiltà bejn ir-repliki tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Kull waħda mis-soluzzjonijiet tat-test imbagħad tithallat ma' ramel kwarzuż kif deskritt fil-paragrafu 22 (eż. 10 g ta' ramel kwarzuż għal kull reċipjent tat-test). Sabiex ir-ramel kwarzuż jixxarrab kompletament, volum ta' 0,20 — 0,25 ml għal kull gramma ta' ramel instab li huwa suffiċjenti. Minn hemm 'il quddiem, is-solvent għandu jiġi evaporat sa ma jinxef. Sabiex jitnaqqsu t-telfiet tas-sustanza kimika tat-test permezz tal-koevaporazzjoni (eż. skont il-pessjoni tal-fwar tas-sustanza kimika), ir-ramel miksi għandu jintuża minnufih wara li jitnixxef. Ir-ramel xott jithallat ma' ammont xieraq ta' naqal formulat tal-livell ta' konċentrazzjoni korrispondenti. L-ammont ta' ramel ipprovdut mit-tahlita ta' ramel u sustanza kimika tat-test għandu jittqies meta jiġi ppreparat in-naqal (jiġifieri n-naqal għandu għalhekk jiġi ppreparat b'inqas ramel). Il-vantaġġ ewlieni ta' din il-proċedura huwa dak li virtwalment ma jiddaħhal ebda solvent fin-naqal (7). Inkella, eż. għal naqal tal-ghelieqi, is-sustanza kimika tat-test tista' tiżdied b'porzjon xott u mithun irqiq tan-naqal kif deskritt hawn fuq għar-ramel kwarzuż, jew billi s-sustanza kimika tat-test tithallat fin-naqal imxarrab, b'evaporazzjoni sussegwenti ta' kwalunkwe aġent solubilizzanti użat. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda man-naqal tiġi distribwita sew u b'mod uniformi fin-naqal. Jekk ikun meħtieġ, jistgħu jiġu analizzati s-sottokampjuni biex jiġu kkonfermati l-konċentrazzjonijiet fil-mira fin-naqal, u biex jiġi

▼ M6

ddeterminat il-grad ta' omogenità. Jaf ikun utli li jiġu analizzati s-sottokampjuni tas-soluzzjonijiet tat-test biex jiġu kkonfermati l-koncentrazzjonijiet fil-mira fin-naqal. Peress li solvent jintuża għall-kisi tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-ramel kawruż, għandu jintuża kontroll tas-solvent li jiġi ppreparat bl-istess ammont ta' solvent bħan-naqal tat-test. Għandu jiġi rrapportat il-metodu użat għaż-żieda, u r-raġunijiet għall-għażla ta' proċedura ta' żieda speċifika minbarra dik deskritta hawn fuq. Il-metodu ta' żieda jista' jiġi adattat għall-proprietajiet fizikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, eż. biex jiġi evitat telf minhabba volatilizzazzjoni matul iż-żieda jew l-ekwilibrizzjoni. Gwida addizzjonali dwar il-proċeduri ta' żieda tingħata f'Environment Canada (1995) (46).

29. Ladarba n-naqal miżjud ikun ġie ppreparat, distribwit fir-reċipjenti tat-test tar-repliki, u mimli bil-ilma tat-test, huwa rakkomandabbli li tkun tista' ssir il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test min-naqal għall-fażi milwiema (eż. (3)(7)(9)). Dan preferibbilment għandu jsir fil-kundizzjonijiet ta' temperatura u arjażzjoni użati fit-test. Il-hin ta' ekwilibrizzjoni xieraq huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanzi kimiċi, u jista' jkun f'ordni ta' sigħat sa jiem u f'kazijiet rari sa diversi ġimgħat (4-5 ġimgħat) (eż. (27)(47)). F'dan it-test, ekwilibrizzjoni mhuwiex mistenni, iżda huwa rakkomandat perjodu ta' ekwilibrizzjoni ta' 48 siegħa sa 7 ijiem. Għalhekk, il-hin għad-degradazzjoni tas-sustanza kimika tat-test sejjer kemm jista' jkun jitnaqqas. Skont il-fini tal-istudju, eż. meta jridu jiġu imitati kundizzjonijiet ambjentali, in-naqal miżjud jista' jiġi ekwilibrat jew jitqaddem għal perjodu itwal.
30. Fi tmien dan il-perjodu ta' ekwilibrizzjoni, għandhom jittiehdu kampjuni tal-inqas tal-ilma tal-madwar u n-naqal aggregat, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjonijiet u wahda iktar baxxa, għall-analiżi tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Dawn l-analiżijiet kwantitattivi tas-sustanza kimika tat-test għandhom jippermettu l-kalkolu tal-bilanċ tal-massa u espressjoni tar-risultati abbażi tal-konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu. B'mod ġenerali, il-kampjun ifixkel jew jeqred is-sistema tal-ilma/naqal. Għalhekk, ġeneralment mhuwiex possibbli li jintużaw l-istess repliki għall-kampjunar tan-naqal u d-dud. Għandhom jiġu stabbiliti reċipjenti "analitiċi" ta' dimensjonijiet xierqa, li jiġu ttrattati bl-istess mod (inkluz il-preżenza tal-organizmi tat-test) iżda li ma jintużawx għal osservazzjonijiet bijoloġiċi. Id-dimensjonijiet tar-reċipjent għandhom jintgħażlu biex jipprovdu l-ammont ta' kampjuni mehtieġa mill-metodu analitiku. Dettalji tal-kampjunar huma deskritti fil-paragrafu 53.

TWETTIQ TAT-TEST

Test preliminari

31. Jekk ma tkun disponibbli ebda informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza kimika tat-test għal *Lumbriculus variegatus*, jaf ikun utli li jitwettagħ esperiment preliminari sabiex tiġi ddeterminata l-medda ta' konċentrazzjonijiet li għandhom jiġu ttestjati fit-test finali, u biex jittejjbu l-kundizzjonijiet tat-test tat-test finali. Għal dan il-ghan, tintuża serje ta' konċentrazzjonijiet distanzjati tas-sustanza kimika tat-test. Id-dud jiġi espost għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għal perjodu (eż. 28 jum bħal fit-test finali) li jippermetti stima tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa; mhuma mehtieġa ebda repliki. L-imġiba tad-dud, pereżempju l-evitar tan-naqal, li jista' jiġi kkawżat mis-sustanza kimika tat-test u/jew in-naqal, għandha tiġi osservata u rreġistrata matul test preliminari. Il-konċentrazzjonijiet oghla minn 1 000 mg/kg ta' piz xott tan-naqal ma għandhomx jiġu ttestjati fit-test preliminari.

Test finali

32. Fit-test finali, għandhom jintużaw u jintgħażlu tal-inqas hames konċentrazzjonijiet, eż. abbażi tar-risultat tat-test preliminari tas-sejba tal-medda (paragrafu 31) u kif deskritt fil-paragrafi 35, 36, 37 u 38.

▼ M6

33. Isir kontroll (għar-replikazzjoni ara l-paragrafi 36, 37 u 38) li fih il-kostitwenti kollha, hlief is-sustanza kimika tat-test, flimkien ma' serje ta' testijiet. Jekk jintuza xi agent solubilizzanti għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, dan għandu jkollu effett sinifikanti fuq l-organizmi tat-test kif żvelat minn kontroll addizzjonali b'solvent biss.

Disinn tat-test

34. Id-disinn tat-test huwa relatat mal-ghazla tan-numru u l-ispazjar tal-koncentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' reċipjenti f'kull koncentrazzjoni u n-numru ta' dud miżjud f'kull reċipjent. Id-disinji għall-istima tal-EC_x, għall-istima tal-NOEC, u għat-twettiq ta' test tal-limitazzjoni huma deskritti fil-paragrafi 35, 36, 37 u 38.
35. Il-koncentrazzjoni ta' effetti (eż. EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀) u l-firxa ta' koncentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza kimika għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom ikunu "bracketed" bil-koncentrazzjonijiet inkluzi fit-test. Estrapolazzjoni ferm iktar baxxa mill-inqas koncentrazzjoni li taffettwa l-organizmi tat-test jew iktar mill-ogħla koncentrazzjoni ttestjata għandha tiġi evitata. Jekk — f'każijiet eċċezzjonali — issir estrapolazzjoni bhal din, għandha tingħata spjegazzjoni shiha fir-rapport.
36. Jekk għandha tiġi stmata l-EC_x, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas hames koncentrazzjonijiet u minimu ta' tliet repliki għal kull koncentrazzjoni; sitt repliki huma rakkomandati għall-kontroll jew — jekk jintuza — il-kontroll tas-solvent sabiex tittejjeb l-istima tal-varjabbiltà tal-kontroll. Xorta waħda huwa rakkomandat li jintużaw koncentrazzjonijiet tat-test suffiċjenti biex ikun hemm stima tal-mudell tajba. Il-fattur bejn il-koncentrazzjonijiet ma għandux ikun iktar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet meta l-kurva koncentrazzjoni rispons għandha gradjent baxx). In-numru ta' repliki f'kull trattament jista' jtnaqqas jekk jiżdied in-numru ta' koncentrazzjonijiet tat-test b'risponsi fil-medda ta' 5 – 95 %. Iż-żieda fin-numru ta' repliki jew it-tnaqqis fid-daqs tal-intervalli tal-koncentrazzjonijiet tat-test għandhom it-tendenza li jwasslu għal intervalli ta' kunfidenza iqsar għat-test.
37. Jekk għandhom jiġu stmati l-valuri LOEC/NOEC, għandhom jintużaw tal-inqas hames koncentrazzjonijiet tat-test b'tal-inqas erba' repliki (huma rakkomandati sitt repliki għall-kontroll jew — jekk jintuza — il-kontroll tas-solvent sabiex tittejjeb l-istima tal-varjabbiltà ta' kontroll), u l-fattur bejn il-koncentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn. F'Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipotezi fir-ring test tal-metodu ta' ttestjar.
38. Jista' jitwettaq test tal-limitu (permezz ta' koncentrazzjoni tat-test waħda u l-kontrolli), jekk ma jkun mistennija ebda effetti sa 1 000 mg/kg ta' piż xott tan-naqal (eż. minn test preliminari tas-sejba tal-medda), jew jekk l-ittestjar f'koncentrazzjoni waħda sejjer ikun adegwat biex jikkonferma valur ta' interess tal-NOEC. F'dan l-aħhar każ, għandu jiġi inkluzi raġunament iddettaljat għall-ghazla tal-koncentrazzjoni tal-limitu fir-rapport tat-test. Il-fini tat-test tal-limitu huwa li jitwettaq test f'koncentrazzjoni suffiċjentement għolja biex daww li jiehdu d-deċiżjonijiet ikunu jistgħu jeskludu l-effetti tossiċi possibbli tas-sustanza kimika, u l-limitu huwa stabbilit f'koncentrazzjoni li mhijiex mistennija li tidher f'xi sitwazzjoni. Huwa rakkomandat 1 000 mg/kg (piż xott). Generalment, tal-inqas huma meħtieġa sitt repliki kemm għat-trattament kif ukoll il-kontrolli. F'Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipotezi fir-ring test tal-metodu ta' ttestjar.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni*Organizmi tat-test*

39. It-test jitwettaq b'tal-inqas 10 dud għal kull replikat użat għad-determinazzjoni tal-parametri bijoloġiċi. Dan in-numru ta' dud jikkorrispondi għal madwar 50 — 100 mg ta' bijomassa mxarrba. Jekk wiehed jassumi kontenut xott ta' 17,1 % (48), dan jirriżulta f'madwar 9 — 17 mg ta' bijomassa xotta

▼ **M6**

għal kull reċipjent. U.S. EPA (2000 (7)) trakkomanda li tintuza rata ta' tagħbija li ma taqbix 1: 50 (bijomassa xotta: TOC). Għan-naqal formulat deskritt fil-paragrafu 22, dan jikkorrisponi għal madwar 43 g ta' naqal (piż xott) għal kull 10 dud f'kontenut ta' TOC ta' 2,0 % ta' naqal xott. F'każijiet fejn jintużaw iktar minn 10 dud għal kull reċipjent, l-ammont ta' naqal u ilma tal-madwar għandu jiġi aġġustat kif xieraq.

40. Id-dud użat f'test għandu joriġina kollu mill-istess sors, u għandu jkun annimal fi stat psikologiku simili (ara l-Appendiċi 5). Għandu jintgħazel dud ta' daqs simili (ara l-paragrafu 39). Huwa rakkomandat li sottokampjun tal-lott jew l-istokk tad-dud jintiżen qabel it-test sabiex jiġi stmat il-piż medju.
41. Id-dud li għandu jintuza fit-test jitneħħa mill-kultura (ara l-Appendiċi 5 għal dettalji). Annimali (adulti) kbar li ma juru ebda sinjali ta' frammentazzjoni riċenti jiġu ttrasferiti lejn dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma nadif. Dawn jiġu sinkronizzati sussegwentement kif deskritt fl-Appendiċi 5. Wara rigenerazzjoni għal perjodu ta' 10 sa 14-il jum, għat-test għandu jintuza dud komplet intatt b'daqs simili, li jkun attivament qiegħed jgħum jew jitkaxkar wara stimulu mekkaniku bil-mod. Jekk il-kundizzjonijiet tat-test huma differenti mill-kundizzjonijiet tal-kultura (eż. fit-temperatura, ir-regim ta' dawl, u l-ilma tal-madwar), fażi ta' akklimazzjoni ta' eż. 24 siegħa f'temperatura, regim tad-dawl, u permezz tal-istess ilma tal-madwar bħal fit-test għandha tkun suffiċjenti biex id-dud jiġi adattat għall-kundizzjonijiet tat-test. L-oligochaetes adattati għandhom jiġu allokat i b'mod każwali għar-reċipjenti tat-test.

Tagħlif

42. Peress li l-ikel jiżdied man-naqal qabel (jew matul) l-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, id-dud ma jergax jingħalef matul it-test.

Dawl u temperatura

43. Il-fotoperjodu fil-kultura u t-test, ġeneralment huwa ta' 16-il siegħa (3), (7). L-intensità tad-dawl għandha tinzamm baxxa (eż. 100-500 lx) biex jiġu imitati kundizzjonijiet naturali f'wiċċ in-naqal, u titkejjel tal-inqas darba matul il-perjodu ta' espożizzjoni. It-temperatura għandha tkun ta' 20 °C ± 2 °C matul it-test kollu. F'data ta' kejl wahda partikolari, id-differenza tat-temperatura bejn ir-reċipjenti tat-test ma għandhiex tkun iktar minn ± 1 °C. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitqiegħdu fl-inkubatur tal-ittestjar jew l-erja tal-ittestjar b'mod randomizzat, eż. sabiex titnaqqas l-imparzjalità tar-riproduzzjoni minhabba l-post tar-reċipjent.

Arjazzjoni

44. L-ilma tal-madwar tar-reċipjenti tat-test għandu jiġi arjat bil-mod (eż. 2 — 4 bużżieqa fis-sekonda) permezz ta' pasteur pipette li titqiegħed madwar 2 cm 'il fuq minn wiċċ in-naqal biex b'hekk titnaqqas il-perturbazzjoni tan-naqal. Wieħed għandu joqgħod attent li l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu mahlul ma taqax taht it-30 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV). Il-provvista tal-arja għandha tiġi kkontrollata u — jekk ikun meħtieġ — aġġustata tal-inqas darba kuljum fil-jiem tax-xogħol.

Kejliet tal-kwalità tal-ilma

45. Il-parametri tal-kwalità tal-ilma li ġejjin għandhom jitkejlu fl-ilma tal-madwar:

Temperatura:	tal-inqas reċipjent tat-test wieħed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wieħed tal-kontrolli darba fil-ġimgħa u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; jekk ikun possibbli, it-temperatura fil-midjum tal-madwar (l-arja tal-ambjent jew banjumarja) tista' tiġi rreġistrata eż. f'intervalli ta' siegħa;

▼ M6

Kontenut ta' ossi-genu dissolt:	tal-inqas f'reċipjent tat-test wiehed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wiehed tal-kontrolli darba fil-gimgha u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; espress bhala mg/l u % ASV (valur ta' saturazzjoni tal-arja);
Provvista tal-arja:	għandha tiġi kkontrollata tal-inqas darba kuljum fil-jiem tax-xogħol u — jekk ikun meħtieġ — aġġustata;
pH:	tal-inqas f'reċipjent tat-test wiehed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni u reċipjent tat-test wiehed tal-kontrolli darba fil-gimgha u fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni;
Ebusija totali tal-ilma:	tal-inqas replikat wiehed tal-kontrolli u reċipjent tat-test wiehed bl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u t-tmiem tal-perjodu ta' espożizzjoni; espressa bhala mg/l CaCO ₃ ;
Kontenut totali ta' ammonijaka:	tal-inqas replikat wiehed tal-kontrolli u f'reċipjent tat-test wiehed ta' kull livell ta' konċentrazzjoni fil-bidu tal-perjodu ta' espożizzjoni, u sussegwentement 3 darbiet fil-gimgha; espress bhala mg/l NH ₄ ⁺ jew NH ₃ jew ammonijaka-N totali.

Jekk il-kejl tal-parametri tal-ilma jeħtieġ it-tnehhija ta' kampjuni sinifikanti ta' ilma mir-reċipjenti, jaf ikun rakkomandabbli li jiġu stabbiliti reċipjenti separati għall-kejl tal-kwalità tal-ilma sabiex ma jinbidilx il-proporzjon ta' volum ta' ilma/naqal.

Osservazzjonijiet bijoloġiċi

46. Matul l-espożizzjoni, ir-reċipjenti tat-test għandhom jiġu osservati sabiex tiġi vvalutata viżwalment kwalunkwe differenza fid-dud (eż. l-evitar tan-naqal, gerbub tal-ippurgar vizibbli fuq wiċċ in-naqal) meta mqabbel mal-kontrolli. L-osservazzjonijiet għandhom jiġu rreġistrati.
47. Fi tmiem it-test, kull replikat jiġi eżaminat (reċipjenti addizzjonali ddisinjati għall-analizijiet tas-sustanzi kimiċi jistgħu jiġu esklużi mill-eżaminazzjoni). Għandu jintuża metodu xieraq biex jiġi rkuprat id-dud kollu mir-reċipjent tat-test. Għandha tingħata attenzjoni li d-dud kollu jiġi rkuprat mingħajr ma jwegġa'. Metodu possibbli partikolari huwa li d-dud jingħadda permezz ta' passatur min-naqal. Tista' tintuża xibka tal-azzar inossidabbli b'daqx xieraq tax-xibka. Il-parti l-kbira tal-ilma tal-madwar jitferra' b'attenzjoni, u n-naqal li jifdal u l-ilma jiġi aġitat biex jirriżulta f'sospensjoni magħquda, li jista' jingħadda mill-passatur. Permezz ta' xibka ta' 500 µm, il-parti l-kbira tal-frak tan-naqal sejjer jgħaddi mill-passatur malajr; madankollu, l-għarbil għandu jsir malajr, sabiex id-dud ma jkunx jista' jtkaxkar fix-xibka jew minn go fiha. Permezz ta' xibka ta' 250 µm, id-dud mhux sejjer ikun jista' jixkaxkar fix-xibka jew minn go fiha; madankollu, għandha tingħata attenzjoni biex kemm jista' jkun ftit frak tan-naqal jinżamm fuq ix-xibka. Is-sospensjoni magħquda li tingħadda minn passatur ta' kull reċipjent tar-replikati tista' tingħadda mill-passatur għal darb'ohra sabiex jiġi żgurat l-irkupru tad-dud kollu. Metodu alternattiv jista' jkun it-tishin tan-naqal billi r-reċipjenti tat-test jitqiegħdu f'banjumarija f'50 — 60 °C; id-dud sejjer jitlaq min-naqal u jista' jingabar minn wiċċ in-naqal permezz ta' pipetta b'fetha wiesgħa illostrata bin-nar. Metodu alternattiv ieħor jista' jkun li tiġi prodotta sospensjoni magħquda tan-naqal u din titferra' f'dixx baxx ta' daqs xieraq. Mis-saff baxx ta' sospensjoni magħquda, id-dud jista' jingabar permezz ta' labra tal-azzar jew pinzetta tal-arloġġiera (li għandha tintuża bhala furketta iktar milli pinzetta biex tiġi evitata hsara fid-dud) u jiġu ttrasferiti lejn ilma nadif. Wara li d-dud jiġi sseparat mis-sospensjoni magħquda tan-naqal, dan jitlehla fil-midjum tat-test u jingħadd.
48. Indipendentement mill-metodu użat, il-laboratorji għandhom juru li l-persunal tagħhom jista' jirkupra medja ta' mill-inqas 90 % tal-organizmi min-naqal kollu. Perezempju, numru partikolari ta' organizmi tat-test

▼ **M6**

jista' jizzied man-naqal ta' kontroll jew in-naqal tat-test, u l-ikupru jista' jiġi ddeterminat wara siegħa (7).

49. In-numru totali ta' individwi haġġin u mejtin għal kull replikat għandu jiġi rreġistrat u vvalutat. Il-gruppi li ġejjin ta' dud huma kkunsidrati mejtin:

a) ma jkun hemm ebda reazzjoni wara stimulu mekkaniku bil-mod

b) ikun hemm sinjali ta' dekompożizzjoni (flimkien ma' "a")

c) għadd ta' dud nieqes

Barra minn hekk, id-dud haġ jista' jiġi assenjat għal wiehed minn tliet gruppi:

a) dud shiħ kbir (adult) mingħajr partijiet tal-gisem rigenerati

b) dud shiħ b'partijiet tal-gisem rigenerati, b'kulur iktar ċar (jiġifieri, b'parti ta' wara ġdida, b'parti ta' quddiem ġdida, jew biż-żewġ partijiet ġodda)

c) dud mhux shiħ (jiġifieri, dud frammentat reċentement b'partijiet tal-gisem mhux rigenerati)

Dawn l-osservazzjonijiet addizzjonali mhumie x obligatorji, izda jistgħu jintużaw għall-interpretazzjoni tar-riżultati bijoloġiċi (pereżempju, numru ikbar ta' dud assenjat lill-grupp ċ jista' jindika dewmien fir-riproduzzjoni jew ir-rigenerazzjoni fi trattament partikolari). Barra minn hekk, jekk tiġi osservata kwalunkwe differenza fid-dehra (eż. feriti tal-qoxra, partijiet tal-gisem edematuzi) bejn id-dud ittrattat u dak tal-kontroll, dawn għandhom jiġu rreġistrati.

50. Ezattament wara l-għadd/valutazzjoni, id-dud haġ misjub f'kull replikat jiġi ttrasferit f'dixxijiet ta' użin mnixxfa, imwieżna minn qabel u ttikkettati (wiehed għal kull replikat), u maqtula permezz ta' qatra ta' etanol għal kull dixx ta' użin. Id-dixxijiet ta' użin jitqiegħdu f'forn tat-tnixxif f'temperatura ta' 100 ± 5 °C biex jinxfu matul il-lejl, li jintiżnu wara li jitberdu f'dessikatur, (preferibbilment fi grammi, tal-inqas b'4 numri wara l-punt deċimali).

51. Minbarra l-piż xott totali, il-piż xott mingħajr irmied jista' jiġi ddeterminat kif deskritt f'(49) sabiex jitqiesu l-komponenti inorganici li jorġinaw minn naqal ingestit misjuba fil-passaġġ alimentari tad-dud.

52. Il-bijomassa hija ddeterminata bħala l-bijomassa totali għal kull replikat li jinkludi dud adult u ta' età żgħira. Id-dud mejjet ma għandux jitqies għad-determinazzjoni tal-bijomassa għal kull replikat.

Verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test

Kampjunar

53. Għandhom jittiehdu tal-inqas kampjuni għall-analiżi kimika tas-sustanza kimika tat-test tal-ogħla konċentrazzjoni u wahda iktar baxxa, tal-inqas fi tmiem il-fażi ta' ekwilibrazzjoni (qabel iż-żieda tal-organizmi tat-test), u tal-inqas fi tmiem it-test. Tal-inqas in-naqal aggregat u l-ilma tal-madwar għandhom jiġu kkampjunati għall-analiżi. Għandhom jittiehdu tal-inqas żewġ kampjuni għal kull matriċi u trattament f'kull data tal-kampjunar. Wiehed mill-kampjuni tad-duplikati jista' jinħażen bħala riżerva (li għandha tiġi analizzata eż. f'każ li l-analiżi inizjali ma taqax fil-medda ± 20 % mill-konċentrazzjoni nominali). F'każ ta' proprjetajiet kimiċi speċifiċi, eż. jekk tkun mistennija degradazzjoni rapida tas-sustanza kimika tat-test, l-iskeda

▼ **M6**

analitika tista' tiġi rfinata (eż. kampjunar iktar frekwenti, analiżi ta' iktar livelli ta' konċentrazzjoni) abbażi ta' ġudizzju espert. Imbagħad jistgħu jittiehdu kampjuni f'dati ta' kampjunar intermedji (eż. fis-seba' jum wara l-bidu tal-espożizzjoni).

54. L-ilma sovrastanti għandu jiġi kkampjunat b'dekantazzjoni jew billi l-ilma tal-madwar jingħadda b'attenzjoni f'sifun biex b'hekk titnaqqas il-perturbazzjoni tan-naqal. Il-volum tal-kampjuni għandu jiġi rreġistrat.
55. Wara li l-ilma sovrastanti jkun tneħħa, in-naqal għandu jiġi omoġenizzat u ttrasferit lejn kontenitur xieraq. Il-piż tal-kampjun tan-naqal imxarrab jiġi rreġistrat.
56. Jekk tkun mehtieġa wkoll analiżi tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma interstizjali, il-kampjuni tan-naqal omoġenizzati u ppeżati għandhom jiġu ċentrifugati biex jinkiseb l-ilma interstizjali. Pereżempju, madwar 200 ml min-naqal imxarrab jista' jmtela f'bekkijiet ta' ċentrifugazzjoni ta' 250 ml. Minn hemm 'il quddiem, il-kampjuni għandhom jiġu ċentrifugati mingħajr filtrazzjoni biex jiġi iżolat l-ilma interstizjali, eż. $f'10\,000 \pm 600 \times g$ għal 30 — 60 min f'temperatura li ma taqbiżx it-temperatura użata fit-test. Wara ċentrifugazzjoni, is-supernatant jiferra' jew jisseffed, filwaqt li tingħata attenzjoni biex ma jiġi introdott ebda frak tan-naqal, u l-volum jiġi rreġistrat. Il-piż tal-gerbub tan-naqal li jifdal jiġi rreġistrat. Dan jista' jiffaċilita l-istima tal-bilanċ tal-massa jew l-irkupru ta-sustanza kimika tat-test fis-sistema tal-ilma/naqal, jekk il-piż xott tan-naqal jiġi ddeterminat f'kull data ta' kampjunar. F'xi każijiet, jaf ma jkunx possibbli li jiġu analizzati l-konċentrazzjonijiet fl-ilma interstizjali peress li l-kampjun tad-daqs ikun zgħir wisq.
57. Jekk ma ssirx analiżi minnufih, il-kampjuni kollha għandhom jinħażnu b'metodu xieraq, eż. fil-kundizzjonijiet ta' ħzin rakkomandati għal degradazzjoni minima tas-sustanza kimika tat-test partikolari (eż. kampjuni ambjentali ġeneralment jinħażnu f'— 18 °C fid-dlam). Ikseb informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet ta' ħzin xierqa għas-sustanza kimika tat-test partikolari — pereżempju d-durata u t-temperatura tal-ħzin, il-proċeduri ta' estrazzjoni, eċċ. — qabel ma tibda l-istudju.

Metodu analitiku

58. Peress li l-proċedura shiha hija essenzjalment irregolata mill-eżattezza, il-preċiżjoni u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza kimika tat-test, iċċekkja b'mod sperimentali li l-preċiżjoni u r-riproducibbiltà tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test minn kampjuni tal-ilma u tan-naqal huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari tal-inqas fl-oghla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Barra minn hekk, iċċekkja li s-sustanza kimika tal-ittesjar mhijiex identifikabbli fil-kompartimenti ta' kontroll f'konċentrazzjonijiet oghla mil-limitu ta' kwantifikazzjoni. Jekk ikun mehtieġ, ikkoreġi l-konċentrazzjonijiet nominali għall-irkupri taż-zidiet ta' kontroll tal-kwalità (eż. fejn l-irkupru ma jaqax taħt 80 — 120 % tal-ammont mizjud). Immaniġġja l-kampjuni kollha matul it-test b'tali mod li titnaqqas il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirriżultaw mill-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test fl-apparat tal-kampjunar).
59. Għandhom jiġu rreġistrati u rrapportati l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, u l-limitu ta' detezzjoni fin-naqal u l-ilma.

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

60. Il-varjabbli ta' rispons obbligatorji ewlenin tat-test li għandhom jiġu evalwati statistikament huma l-bijomassa u n-numru totali ta' dud għal kull replikat. B'mod fakultattiv, jistgħu jiġu evalwati wkoll ir-riproduzzjoni (bħala zieda fin-numru ta' dud) u t-tkabbir (bħala zieda fil-bijomassa xotta). F'dan il-każ, għandha tinkiseb stima tal-piż xott tad-dud fil-bidu tal-espożizzjoni eż. bil-kejl tal-piż xott ta' sottokampjun rappreżentattiv tal-lott tad-dud sinkronizzat li għandu jintuza għat-test.

▼ M6

61. Ghalkemm il-mortalità mhijiex punt ta' tmiem ta' dan it-test, il-mortalitajiet għandhom jiġu evalwati kemm jista' jkun. Sabiex jiġu stmati l-mortalitajiet, in-numru ta' dud li ma jkollhomx reazzjoni għal stimulu mekkaniku bil-mod jew urew sinjali ta' dekompożizzjoni, u d-dud nieqes għandhom jiġu kkunsidrati mejta. Il-mortalitajiet għandhom tal-inqas jiġu rreġistrati u kkunsidrati meta jiġu interpretati r-risultati tat-test.
62. Il-konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom jiġu espressi bħala mg/kg ta' piż xott tan-naqal. Jekk l-irkupru tas-sustanza kimika tat-test imkejla fin-naqal, jew fin-naqal u l-ilma tal-madwar fil-bidu tal-espożizzjoni, huwa bejn 80 % u 120 % tal-konċentrazzjonijiet nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett (EC_x , NOEC, LOEC) jistgħu jiġu espressi abbażi ta' konċentrazzjonijiet nominali. Jekk l-irkupru jiddevja mill-konċentrazzjonijiet nominali b'aktar minn ± 20 % tal-konċentrazzjonijiet nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett (EC_x , NOEC, LOEC) għandhom ikunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla fil-bidu tal-espożizzjoni, eż. billi jitqies il-bilanċ tal-massa tas-sustanza kimika tat-test fis-sistema tat-test (ara l-paragrafu 30). F'dawn il-kazijiet, tista' tinkiseb informazzjoni addizzjonali mill-analiżi tas-soluzzjonijiet ewlenin u/jew tal-applikazzjoni sabiex jiġi kkonfermat li n-naqal tat-test kien ippreparat sew.

 EC_x

63. Valuri EC_{xg} għall-parametri deskritti fil-paragrafu 60 huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni logistika jew Weibull, metodu Spearman-Kärber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi). $F'(15)$ u (50) tingħata gwida dwar l-evalwazzjoni statistika. EC_x tinkiseb billi jiddaħħal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l- EC_{50} jew kwalunkwe EC_x , il-medji għal kull trattament ($\bar{X}$) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-riġressjoni.

NOEC/LOEC

64. Jekk analiżi statistika hija mahsuba biex tiddetermina l-NOEC/LOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa. B'mod ġenerali, l-effetti avversi tal-oġġett tat-test meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżghar) bi tmiem wiehed $f_p \leq 0,05$. Eżempji jingħataw fil-paragrafi li ġejjin. $F'(15)$ u (50) tingħata gwida dwar is-selezzjoni ta' metodi statistiċi xierqa.
65. Id-distribuzzjoni normali tad-dejta tista' tiġi ttestjata eż. bit-test tat-tjubija tal-adattament ta' Kolmogorov-Smirnov, it-test tal-Proporzjoni ta' devjazzjoni tal-medda mill-istandard (test R/s) jew it-test Shapiro-Wilk (b'zewġ naħat, $p \leq 0,05$). Biex tiġi ttestjata l-varjanza tal-omoġenità jistgħu jintużaw it-test ta' Cochran, it-test ta' Levene jew it-test ta' Bartlett, (b'zewġ naħat, $p \leq 0,05$). Jekk il-prerekwiziti tal-proċeduri tal-ittestjar paramettriċi (in-normalità, l-omoġenità tal-varjanza) jiġu ssodisfati, tista' titwettaq Analizi tal-Varjanza (ANOVA) b'Direzzjoni waħda u testijiet ta' tqabbil b'diversi paraguni sussegwenti. Paraguni f'koppji (eż. test-t ta' Dunnett) jew testijiet tat-tendenza rigressiva (eż. test ta' Williams) jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi sinifikanti ($p \leq 0,05$) bejn il-kontrolli u d-diversi konċentrazzjonijiet tal-punti tat-test. Inkella, għandhom jintużaw metodi mhux paramettriċi (eż. it-test-U ta' Bonferroni skont it-test ta' tendenza ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) biex jiġi ddeterminati l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

66. Jekk isir test tal-limitu (tqabbil tal-kontroll u kura waħda biss) u jiġu ssodisfati l-prerekwiziti tal-proċeduri tal-ittestjar parametrik (in-normalità, l-omoġenità), ir-risponsi metriċi (numru totali ta' dud, u l-bijomassa bħala piż xott tad-dud) jistgħu jiġu evalwati mit-Test tal-istudenti (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux uguali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametrik, bhat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiziti ma jiġux issodisfati. Fl-Appendiċi 6 tingħata xi informazzjoni dwar is-setgħa statistika misjuba matul l-ittestjar tal-ipoteżi fir-ring test tal-metodu.

▼ M6

67. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistgħu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Interpretazzjoni tar-riżultati

68. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'attenzjoni, jekk kien hemm devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar, u fejn jistgħu jsejtnu konċentrazzjonijiet imkejja tal-konċentrazzjonijiet tat-test fl-ivell qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku użat. Kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ttestjar għandha tiġi nnotata.

Rapport tat-test

69. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

— *Sustanza kimika tat-test:*

- dejta tal-identifikazzjoni tas-sustanza kimika (isem komuni, isem kimiku, formula strutturali, numru CAS, eċċ.) inklużi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test; sors tas-sustanza kimika tat-test, identità u konċentrazzjoni ta' kwalunkwe solvent użat.
- kwalunkwe informazzjoni disponibbli dwar in-natura fiżika u l-proprietajiet fiżikokimiċi kif miksub qabel il-bidu tat-test, (eż. is-solubilità fl-ilma, il-pessjoni tal-fwar, il-koeffiċjent tal-partizzjoni fil-ħamrija (jew fin-naqal, jekk ikun disponibbli), il-log K_{ow} , l-istabilità fl-ilma, eċċ.);

— *Speċijiet tat-test:*

- ismijiet xjentifiċi, sors, kwalunkwe trattament minn qabel, akklimazzjoni, kundizzjonijiet tal-kulturi, eċċ.

— *Kundizzjonijiet tat-test:*

- proċedura tal-ittestjar użata (statika, semistatika jew bi fluss kontinwu);
- id-disinn tat-test (eż. in-numru, il-materjal u d-daqs tal-kontenituri tat-test, il-volum ta' ilma għal kull reċipjent, il-massa tan-naqal u l-volum għal kull reċipjent, (għal proċeduri bi fluss kontinwu jew semistatiki: ir-rata ta' sostituzzjoni tal-volum tal-ilma), kwalunkwe arjażzjoni użata qabel u matul it-test, in-numru ta' repliki, in-numru ta' dud għal kull replikat fil-bidu tal-espożizzjoni, in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-kundizzjonament, l-ekwilibriju u l-perjodi ta' espożizzjoni, il-frekwenza ta' kampjunar);
- fond tan-naqal u l-ilma tal-madwar;
- metodu tat-trattament minn qabel bis-sustanza kimika tat-test u zieda/applikazzjoni;
- il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, id-dettalji dwar il-kampjunar għall-analiżi tas-sustanzi kimiċi, u l-metodi analitiċi li permezz tagħhom inkisbu l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test;
- il-karatteristiċi tan-naqal kif deskritti fil-paragrafi 24 — 25, u kwalunkwe kejl ieħor li jittiehed; it-thejjja tan-naqal formulat;
- it-thejjja tal-ilma tal-ittestjar (jekk jintuża ilma rikostitwit) u l-karatteristiċi (l-ossigenu, il-konċentrazzjoni, il-pH, il-konduttività, l-ebusija, u kwalunkwe kejl ieħor li jittiehed) qabel il-bidu tat-test;
- informazzjoni ddettaljata dwar it-tagħlif inkluż it-tip ta' ikel, it-thejjja, l-ammont u r-reġim ta' tagħlif;

▼ **M6**

- intensità tad-dawl u fotoperjodu/fotoperjodi;
 - metodi użati għad-determinazzjoni tal-parametri bijoloġiċi kollha (eż. kampjunar, spezzjoni, ippeżar tal-organizmi tat-test) u l-parametri abijotiċi kollha (eż. parametri tal-kwalità tal-ilma u n-naqal);
 - volumi u/jew pizijiet tal-kampjuni kollha għall-analiżijiet tas-sustanzi kimiċi;
 - informazzjoni ddettaljata dwar it-trattament tal-kampjuni kollha għall-analiżi tas-sustanza kimika, inkluż dettalji dwar il-preparazzjoni, il-ħżin, il-proċeduri ta' żieda, l-estrazzjoni, u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sustanza kimika tat-test, u l-irkupri tas-sustanza kimika tat-test.
- *Riżultati:*
- il-kwalità tal-ilma fir-riċipjenti tat-test (il-pH, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlula, l-ebusija, il-konċentrazzjonijiet tal-ammonijaka, u kwalunkwe kejl ieħor li ttiehed);
 - kontenut ta' karbunju organiku totali (TOC), il-proporzjon ta' piż xott ma' piż imxarrab, il-pH tan-naqal, u kwalunkwe kejl ieħor li ttiehed;
 - in-numru totali, u jekk ikun iddeterminat, numru ta' dud shiħ u mhux shiħ f'kull kompartiment tal-ittestjar fi tmiem l-ittestjar;
 - il-piż xott tad-dud ta' kull kompartiment tat-test fi tmien it-test, u jekk jitkejjel, il-piż xott ta' sottokampjun tad-dud fil-bidu tat-test;
 - kwalunkwe imġiba anormali osservata bi tqabbil mal-kontrolli (eż. evitar tan-naqal, il-preżenza jew in-nuqqas ta' gerbub tal-ippurgar);
 - kwalunkwe mortalità osservata;
 - stimi tal-punti ta' tmiem tossiċi (eż. EC_x, NOEC u/jew LOEC), u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom;
 - il-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-konċentrazzjonijiet tat-test imkejla u r-riżultati tal-analiżijiet kollha biex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-riċipjenti tat-test;
 - kwalunkwe devjazzjoni mill-kriterji ta' validità.
- *Evalwazzjoni tar-riżultati:*
- konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkat fil-paragrafu 13;
 - diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

- (1) KE (2003). Dokument ta' Gwida Teknika b'appoġġ għad-Direttiva tal-Kummissjoni 93/67/KEE dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju għal sustanzi godda nnotifikati, ir-Regolament tal-Kummissjoni (KE) Nru 1488/94 dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju għal sustanzi eżistenti u d-Direttiva 98/8/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar it-tqeghid fis-suq tal-prodotti bijoċidali; Parti I — IV. L-Uffiċċju għall-Pubblikazzjonijiet Uffiċjali tal-KE (Kummissjoni Ewropea), il-Lussemburgu.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼ **M6**

- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, "Test tat-tossicità bil-kironomidi tal-ilma-naqal bl-użu ta' naqal miżjud".
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (8) Environment Canada (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.
- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).
- (10) 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.
- (11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (14) 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.
- (15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/
- (16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.
- (17) Bailly H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼ M6

- (18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. *Environmental Toxicology*. 14(2): 271-278.
- (19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133:99-109.
- (20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12(7):1261-1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. *Hydrobiol.* 262:57-63.
- (22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1885-1894.
- (23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- (29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C -17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼ M6

- (33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.
- (34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.
- (35) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.
- (37) Il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Hut, Test tat-Tossiċità Akuta.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.
- (43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.
- (45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.
- (46) Environment Canada (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.
- (47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.
- (48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.
- (49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼ **M6**

- (50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.
- (51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. Marzu 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Letteratura addizzjonali dwar il-proċeduri statistiċi:

- Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.
- Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

▼ M6

Appendiċi 1

Definizzjonijiet

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita.

Il-perjodu ta' kundizzjonament jintuża biex jistabbilizza l-komponent mikrobjali tan-naqal u biex eż. titneħħa l-ammonja li toriġina mill-komponenti tan-naqal; dan isehh qabel iż-żieda tas-sustanza kimika tat-test man-naqal. Generalment, l-ilma tal-madwar jintrema wara l-kundizzjonament.

L-EC_x hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fin-naqal li tirriżulta f'effett ta' X % (eż. 50 %) fuq il-parametru bijoloġiku fi żmien perjodu ta' espożizzjoni ddikjarat.

Il-perjodu ta' ekwilibrazzjoni jintuża biex jippermetti d-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn il-fażi solida, l-ilma interstizjali u l-ilma tal-madwar; dan isehh wara ż-żieda tas-sustanza kimika tat-test man-naqal u qabel iż-żieda tal-organizmi tat-test.

Il-fażi ta' espożizzjoni huwa ż-żmien li matulu l-organizmi tat-test jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test.

Naqal ifformulat jew naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintentiku, huwa tahlita ta' materjali użati biex jiġu imitati l-komponenti fiżiċi ta' naqal naturali.

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test fejn is-sustanza kimika hija osservata għal effett tossiku sinifikanti ($b'p < 0,05$) meta mqabbel mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha 'l fuq mil-LOEC għandu jkollhom effett ugwali jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Jekk dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tinghata spjegazzjoni shiha dwar kif ingħażlu l-LOEC (u għalhekk l-NOEC).

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taht l-LOEC li, meta mqabbla mal-kontroll, ma għandha ebda effett statistiku ($p \leq 0,05$), fil-perjodu ta' espożizzjoni.

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (K_{ow} ; xi drabi espress ukoll bhala P_{ow}) huwa l-proporzjon ta' solubbiltà ta' sustanza kimika f'ottanol-n u fl-ilma f'ekwilibriju u jirrappreżenta l-lipofiliċità ta' sustanza kimika (Kapitolu A.24 ta' dan l-Anness). Il- K_{ow} jew il-logaritmu ta' K_{ow} ($\log K_{ow}$) jintuża bhala indikazzjoni tal-potenzjal ta' kimika għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organizmi akwatiċi.

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni organika karbonju-ilma (K_{oc}) huwa l-proporzjon ta' konċentrazzjoni ta' kimika fi/fuq il-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' hamrija u l-konċentrazzjoni tal-kimika fl-ilma f'ekwilibriju.

Ilma tal-madwar huwa l-ilma li jkopri n-naqal fir-riċipjent tat-test.

Ilma interstizjali huwa l-ilma li jikkupa spazju bejn in-naqal jew il-frak tal-hamrija.

Naqal miżjud huwa naqal li miegħu żdiedet sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test tfisser kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ **M6***Appendiċi 2***Kompożizzjoni tal-ilma rikostitwit rakkomandat**

(adottat mill-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness (1))

(a) *Soluzzjoni ta' klorur tal-kalċju*Holl 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ filma dejonizzat; zid sa 1 l b'ilma dejonizzat(b) *Soluzzjoni tas-sulfat tal-manjeżju*Holl 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ filma dejonizzat; zid sa 1 l b'ilma dejonizzat(c) *Soluzzjoni tal-idroġenu karbonat tas-sodju*Holl 2,59 g NaHCO_3 filma dejonizzat; zid sa 1 l b'ilma dejonizzat(d) *Soluzzjoni tal-klorur tal-potassju*Holl 0,23 g KCl filma dejonizzat; zid sa 1 l b'ilma dejonizzat

Is-sustanzi kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

Il-konduttività tal-ilma distillat jew dejonizzat ma għandhiex taqbeż $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Jithalltu 25 ml kull wiehied ta' soluzzjonijiet (a) sa (d) u l-volum totali li jiżdied sa 1 l b'ilma dejonizzat. It-totali tal-joni tal-kalċju u l-manjeżju f'dawn is-soluzzjonijiet hija ta' 2,5 mmol/l.

Il-proporzjon ta' joni Ca:Mg huwa ta' 4:1 u ta' joni Na:K huwa ta' 10:1. Il-kapaċità tal-aċidu $\text{K}_{\text{S4.3}}$ ta' din is-soluzzjoni hija 0,8 mmol/l.

Żid l-arja mal-ilma dilwit sakemm tintlahaq is-saturazzjoni tal-ossigenu, imbagħad aħżnu għal madwar jumejn mingħajr arjazzjoni ulterjuri qabel l-użu.

REFERENZA

- (1) Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Test tat-Tossicità Akuta fil-Hut.

▼ **M6***Appendiċi 3***Karatteristiċi fiżiko-kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli**

Komponent	Konċentrazzjonijiet
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 µg/l
Ammonja mhux jonizzata	< 1 µg/l
Klorin residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l
(adottata minn OECD (1992) (1))	

REFERENZA

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼ M6

Appendiċi 4

Naqal artifiċjali rakkomandat — gwida dwar il-preparazzjoni u l-ħżin

Kostitwenti tan-naqal

Kostitwent	Karatteristiċi	% tan-naqal piż xott
Pit	<i>Pit ta' sfanju, grad ta' dekompożizzjoni: "midjum", imnixxef bl-arja, l-ebda fdalijiet tal-pjanta viżibbli, mithun irqiq (daqs tal-frak $\leq 0,5$ mm)</i>	$5 \pm 0,5$
Ramel kwarzuż	Daqs tal-frak: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-frak għandu jkun fil-medda ta' 50-200 μm	75 — 76
Tafal tal-kawlina	<i>Kontenut ta' kawlinite ≥ 30 %</i>	20 ± 1
Sors ta' ikel	<i>eż. Trab tal-Urtica (Folia urticae), weraq ta' Urtica dioica (hurrieq), mithuna rqaq (daqs tal-frak $\leq 0,5$ mm); skont l-istandards tal-farmaċija, għall-konsum mill-bniedem; flimkien man-naqal xott</i>	0,4 — 0,5 %
Karbonju organiku	Aġġustat biż-zieda ta' pit u ramel	$2 \pm 0,5$
Karbonat tal-kalċju	CaCO_3 , pulverizzat, kimikament pur, flimkien man-naqal xott	0,05 — 1
Ilma Dejonizzat	Konduttività ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, flimkien man-naqal xott	30 — 50

Nota: Jekk ikunu mistennija konċentrazzjonijiet ta' ammonijaka għoljin, eż. jekk is-sustanza kimika tat-test tkun magħrufa li tinibixxi n-nitrifikazzjoni, jaf ikun utli li tissostitwixxi 50 % tat-trab tal-urtica b'hafna nitroġenu b'ċelluloża (eż. trab ta' Ċelluloża-a, kimikament pur, daqs tal-frak $\leq 0,5$ mm; (1) (2)).

Preparazzjoni

Il-pit jitnixxef bl-arja u mithun għal trab irqiq. Tiġi ppreparata sospensjoni tal-ammont meħtieġ ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat permezz ta' apparat ta' omogenezzazzjoni bi prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal $5,5 \pm 0,5$ b' CaCO_3 . Is-sospensjoni hija kundizzjonata għal tal-inqas jumejn billi tithawwad bil-mod f' 20 ± 2 °C, biex jiġi stabbilizzat komponent mikrobjali stabbli. Il-pH jerga' jitkejjel u għandu jkun $6,0 \pm 0,5$. Imbagħad is-sospensjoni tal-pit tithallat ma' kosistwenti oħra (ramel u tafal tal-kawlina) u ilma dejonizzat biex jinkiseb naqal omogenju b'kontenut ta' ilma f'medda ta' 30–50 fil-mija ta' piż xott tan-naqal. Il-pH tat-tahlita finali jerga' jitkejjel u jiġi aġġustat bejn 6,5 u 7,5 b' CaCO_3 jekk ikun meħtieġ. Madankollu, jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonijaka, jaf ikun utli li l-pH tan-naqal jinżamm inqas minn 7,0 (eż. bejn 6,0 u 6,5). Jitiehdu kampjuni tan-naqal biex jiġi ddeterminat il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonja, in-naqal formulat jaf ikun kundizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jipprevalu fit-test sussegwenti (eż. proporzjon ta' naqal/ilma 1:4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test) qabel ma tiżdied is-sustanza kimika tat-test, jiġifieri għandu

▼ **M6**

jizdied bl-ilma, li għandu jiġi arjat. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Minn hemm 'il quddiem, ir-ramel kwarzuż miżjud jithallat man-naqal għal kull livell ta' trattament, in-naqal jiġi distribwit fir-reċipjenti tat-test tar-repliki, u miżjud mal-ilma tat-test. Imbagħad ir-reċipjenti jiġu inkubati fl-istess kundizzjonijiet li jipprevalu fit-test sussegwenti. Dan huwa fejn jibda il-perjodu ta' ekwilibriju. L-ilma tal-madwar għandu jiġi arjat.

Is-sors ta' ikel magħżul għandu jizdied qabel jew matul iż-żieda tan-naqal bis-sustanza kimika tat-test. Dan jista' inizjalment jithallat mas-sospensjoni tal-pit (ara hawn fuq). Madankollu, degradazzjoni eċċessiva tas-sors tal-ikel qabel iż-żieda tal-organizmi tal-ittejtjar — eż. fil-każ ta' perjodu ta' ekwilibriju twil, tista' tiġi evitata billi l-perjodu ta' żmien bejn iż-żieda tal-ikel u l-bidu ta' espożizzjoni jinżamm kemm jista' jkun qasir. Sabiex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test tiżdied mal-ikel, is-sors tal-ikel għandu jithallat bin-naqal mhux iktar tard mill-jum meta s-sustanza kimika tat-test tiżdied man-naqal.

Hżin

Il-kostitwenti xotti tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u frisk jew f'temperatura tal-kamra. In-naqal ippreparat miżjud bis-sustanza kimika tat-test għandu jintuża fit-test immedjatament. Il-kampjuni tan-naqal miżjud jistgħu jinħażnu fil-kundizzjonijiet rakkomandanti għas-sustanzi kimiċi tat-test partikolari sal-analiżi.

REFERENZI

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. Marzu 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

▼ M6

Appendiċi 5

Metodi ta' kulturi għal *lumbriculus variegatus*

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbrikulidi, Oligochaeta huwa abitant tan-naqal tal-ilma helu u jintuża hafna fl-ittestjar ekotossikologiku. Jista' jiġi kkulturat faċilment f'kundizzjonijiet tal-laboratorju. F'dan li ġej tinghata deskrezzjoni tal-metodi ta' kulturi.

Metodi ta' kulturi

Il-kundizzjonijiet ta' kulturi għal *Lumbriculus variegatus* huma deskritti fid-dettall f'Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Hawn taht jinghata sommarju fil-qosor ta' dawn il-kundizzjonijiet. Vantaġġ ewlieni ta' *L. variegatus* huwa r-riproduzzjoni rapida tiegħu, li tirriżulta f'bijomassa li tiżdied malajr f'popolazzjonijiet ikkulturati fil-laboratorju (eż. (1), (3), (4), (5)).

Id-dud jista' jiġi kkulturat f'akkwarji kbar (57 — 80 l) f'23 °C b'fotoperjodu ta' 16 L:8 D (100 — 1 000 lx) permezz ta' ilma naturali mġedded kuljum (45 — 50 l għal kull akkwarju). Is-sottostrat huwa ppreparat billi jitqatgħu srievet tal-karti kannella mhux ibbliċjati fi strixxi, li mbagħad jistgħu jithalltu mal-ilma tal-kulturi għal ftit sekondi biex jirriżultaw f'biċċiet żgħir tas-sottostrat tal-karta. Dan is-sottostrat imbagħad jista' jintuża direttament fl-akkwarji tal-kultura *Lumbriculus* billi titgħatta ż-żona ta' qiegħ it-tank, jew jinħażen iffrizat f'ilma dejonizzat biex jintuża iktar tard. Sottostrat ġdid fit-tank sejjer ġeneralment idum għal madwar xahrejn.

Kull kultura tad-dud, tinbeda b'500 — 1 000 dudu, u tingħalef sospensjoni ta' 10 ml li fiha 6 g ta' ikel tal-bidu tat-trota 3 darbiet fil-ġimgħa f'kundizzjonijiet ta' tiġdid jew bi fluss kontinwu. Kulturi statiči jew semi statiči għandhom jirċievu rati ta' tagħlif iktar baxxi biex jiġi evitat tkabbir batterjali u fungali.

F'dawn il-kundizzjonijiet, in-numru ta' individwi fil-kultura, is-soltu jirdoppja f'madwar 10 sa 14-il jum.

Inkella *Lumbriculus variegatus* jista' jiġi kkulturat f'sistema li tikkonsisti minn saff ta' ramel kwarzuz kif użat għan-naqal artifiċjali (fond ta' 1 — 2 cm), u ilma rikostitwit. Kontenituri tal-ħġieġ jew l-azzar inossidabbli b'għoli ta' 12 sa 20 cm jistgħu jintużaw bħala reċipjenti tal-kulturi. Il-korp tal-ilma għandu jkun arjat bil-mod (eż. 2 b'żieaq fis-sekonda) permezz ta' pasteur pipette pożizzjonata madwar 2 cm 'il fuq minn wiċċ in-naqal. Biex tiġi evitata akkumulazzjoni eż. tal-ammonijaka, l-ilma tal-madwar għandu jiġi skambjat permezz ta' sistema bi fluss kontinwu, jew, tal-inqas darba f'ġimgħa, manwalment. L-oligochaeti jistgħu jinżammu f'temperatura tal-kamra b'fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl (intensità ta' 100 — 1 000 lx) u 8 sigħat dlam. Fil-kultura semistatika (tiġdid tal-ilma darba f'ġimgħa), id-dud jintgħalef b'TetraMin darbtejn f'ġimgħa (eż. 0,6 — 0,8 mg għal kull cm² ta' wiċċ tan-naqal), li jista' jiġi applikat bħala sospensjoni ta' 50 mg TetraMin għal kull ml ta' ilma dejonizzat.

Lumbriculus variegatus jista' jitneħħa mill-kulturi eż. bit-trasferiment tas-sottostrat b'xibka irqiqa, jew organiżmi permezz ta' pipetta tal-ħġieġ bi ftuħ wiesgħa (dijametru ta' madwar 5 mm) illustrata bin-nar, lejn bekk separat. Jekk sottostrat jiġi ttrasferit lejn dan il-bekk, il-bekk li fih id-dud u s-sottostrat jithalla għal matul il-lejl f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, li sejjrin inehħu s-sottostrat mill-bekk, filwaqt li d-dud jibqa' f'qiegħ ir-reċipjent. Dawn jistgħu jiġu introdotti f'tankijiet ta' kulturi li għadhom kif jiġu ppreparati, jew ipproċessati iktar kif deskritt f'(3) u (4), jew f'dan li ġej.

Kwistjoni li għandha titqies kritika meta jintuża *L. variegatus* f'testijiet tan-naqal huwa l-mod ta' riproduzzjoni tiegħu (arkitomija jew morfallassi, eż. (6)). Din ir-riproduzzjoni asesswali tirriżulta f'żewġ frammenti, li ma jiklux għal ċertu perjodu sakemm ma tiġi ġġenerata l-parti ta' quddiem jew ta' wara (eż. (7), (8)). Dan ifisser li l-espozizzjoni ta' *L. variegatus* permezz ta' ingestjoni ta' naqal ikkontaminat ma sseħħ kontinwament.

▼ **M6**

Għalhekk, għandha titwettaq sinkronizzazzjoni biex jitnaqqsu r-riproduzzjoni u r-rigenerazzjoni mhux ikkontrollati, u l-varjazzjoni għolja sussegwenti fir-riżultati tat-test. Tali varjazzjoni tista' ssehh meta xi individwi, li fframmentaw u għalhekk ma jieklu għal certu perjodu ta' żmien, ikunu inqas esposti għas-sustanza kimika tat-test minn individwi oħra, li ma jifframmentawx matul it-test (9), (10), (11). 10 sa 14-il jum qabel il-bidu tal-espożizzjoni, id-dud għandu jigi fframmentat b'mod artifiċjali (sinkronizzazzjoni). Id-dud (adult) kbir, li preferibbilment ma juri ebda sinjal ta' morfallassi riċenti għandu jintgħażel għas-sinkronizzazzjoni. Dan id-dud jista' jitqiegħed fuq slajd tal-ħġieġ f'taqira ta' ilma tal-kultura, u mifrud fil-parti tal-ġisem medjana bi skalpell. Għandha tingħata attenzjoni li t-truf ta' wara jkun ta' daqs simili. It-truf ta' wara mbagħad għandhom jithallew jirrigeneraw irjus ġodda f'preċipjent tal-kultura li fih l-istess sottostrat kif użat fil-kultura u l-ilma rikostitwit sal-bidu tal-espożizzjoni. Ir-rigenerazzjoni ta' rjus ġodda hija indikata meta d-dud sinkronizzat ikun qiegħed iħaffer fis-sottostrat (il-preżenza ta' rjus rigenerati tista' tiġi kkonfermata bl-ispezzjoni ta' sottokampjun rappreżentattiv taħt mikroskopju binokulari). Minn hemm 'il quddiem, l-organizmi tat-test huma mistennija li jkun fi stat fiżjoloġiku simili. Dan ifisser, li meta r-riproduzzjoni b'morfallassi ssehh f'dud sinkronizzat matul it-test, virtwalment l-annimalli kollha huma mistennija li jkun esposti bl-istess mod għan-naqal miżjud. It-tagħlif tad-dud sinkronizzat għandu jsir malajr kemm jista' jkun wara li d-dud jibda jħaffer fis-sottostrat, jew 7 ijiem wara d-dissezzjoni. Ir-regim ta' tagħlif għandu jkun komparabbli mal-kulturi regolari, iżda huwa rakkomandabbli li d-dud sinkronizzat jintgħalef bl-istess sors ta' ikel li għandu jintuża fit-test. Id-dud għandu jinżamm fit-temperatura tal-ittejtjar 20 ± 2 °C. Wara r-rigenerazzjoni, id-dud shih intatt, li jkun qiegħed jghum jew jtkaxkar permezz ta' stimulu mekkaniku bil-mod, għandu jintuża għall-ittejtjar. Għanda tiġi evitata ħsara jew awtotomija fid-dud, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illustrati bin-nar, jew apparat dentali ta' qbid tal-azzar inossidabbli għall-immaniġġar ta' dan id-dud.

Sorsi ta' kulturi li jibdeu l-fermentazzjoni għal *Lumbriculus variegatus* (indirizzi fil-forma adottata mill-Istati Uniti (4))

Ewropa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germany

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germany

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Il-Finlandja

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommensenstr. 13
D-01062 Dresden
Germany

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

Stati Uniti tal-Amerika

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼ **M6**

U.S. Environmental Protection Agency	Wright State University
Environmental Monitoring System	Institute for Environmental Quality
Laboratory	Dayton, OH 45435
26 W. Martin Luther Dr.	
Cincinnati, OH 45244	

Columbia Environmental Research Center	Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
U.S. Geological Survey	2205 Commonwealth Boulevard
4200 New Haven Road	Ann Arbor, MI 48105-1593
Columbia, MO 65201	

REFERENZI

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
- (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (6) Drewes C.D. & Fournier C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.

▼ **M6**

Appendiċi 6

Sommarju tar-riżultati tar-ringtest

“Test tat-Tossiċità tan-Naqal b'*Lumbriculus variegatus*”

Tabella 1

Riżultati tar-ring test runs individwali: Numru medju ta' dud fil-kontrolli u l-kontrolli tas-solvent fi tmiem it-test; SD=devjazzjoni standard; CV = koeffiċjent ta' varjazzjoni.

	numru medju ta' dud fil-kontrolli	SD	CV (%)	n	numru medju ta' dud fil-kontrolli tas-solvent	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
medja interlabo-ratorja	29,59		20,10		30,61		13,26	
SD	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
min	16,3				15,0			
mass	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

▼ **M6**

Tabella 2

Riżultati tar-ring test runs individwali: Medja tal-piż xott tad-dud għal kull replikat fil-kontrolli u l-kontrolli tas-solvent fi tmiem it-test; SD=devjazzjoni standard; CV = koeff. ta' varjazzjoni.

	piż xott totali tad-dud għal kull replikat (kontrolli)	SD	CV (%)	n	piż xott totali tad-dud għal kull replikat (kontrolli tas-solvent)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
medja interlaboratorja	25,15		20,36		27,68		17,53	
SD	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
min	12,9				10,5			
mass	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

▼ **M6**

Tabella 3

Tossiċità tal-PCP: Sommarju tal-punti ta' tmiem fir-ring test; medji laboratorji għal EC₅₀, NOEC u LOEC; SD = devjazzjoni standard; CV = koeffiċjent ta' varjazzjoni.

parametru bijoloġiku		Medja inter- laboratorja (mg/kg)	min	mass	Fattur interlaboratorj- u	SD	CV (%)	medja geome- trika (mg/ kg)
numru totali ta' dud:	EC₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	22,5	7,1	39,1				
piż xott totali tad-dud	EC₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	24,8	10,9	44,7				
mortalità/ sopravivenza	LC₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
riproduzzjoni (żieda fin- numru ta' dud għal kull replikat)	EC₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	29,7	13,9	47,9				
tkabbir (żieda fil-bijomassa għal kull replikat)	EC₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	32,2	13,6	65,2				

MDD: differenza minima traċċabbli mill-valuri tal-kontroll matul l-ittestjar tal-ipoteżi; użata bħala kejl tas-setgħa statistika

REFERENZA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼ M6

C.36. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAD-DUD PREDATORJU
(*HYPOASPIS (GEOLAELEPS) ACULEIFER*) FIL-HAMRIJA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tal-ittestjar (TG) 226 tal-OECD (2008). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa maħsub biex jintuża għall-valutazzjoni tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fil-hamrija fuq il-produttjoni riproduttiva tad-dudu predatorju tal-hamrija *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), u għalhekk jippermetti l-istima tal-inibizzjoni ta' rata ta' tkabbir speċifika tal-popolazzjoni (1,2). Il-produttjoni riproduttiva tfiggħi in-numru ta' friegħ fi tmiem il-perjodu tal-ittestjar. *H. aculeifer* jirrappreżenta livell trofiku addizzjonali għall-ispeċi li diġà jkunu disponibbli għaliha metodi ta' ttestjar. Test tar-riproduzzjoni mingħajr diskriminazzjoni u kwantifikazzjoni tal-istadji differenti taċ-ċiklu riproduttiv huwa kkunsidrat adegwat għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar. Għal sustanzi kimiċi b'xenarju ta' espożizzjoni iehor milli l-hamrija, l-approċċi tal-hamrija l-oħra jaf ikunu xierqa (3).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* huwa kkunsidrat rappreżentant rilevanti tal-fawna tal-hamrija u d-dud predatorju b'mod partikolari. Huwa mxxerred madwar id-dinja (5) u jista' jingabar u jitrabba faċilment fil-laboratorju. Sommarju tal-bijoloġija ta' *H. aculeifer* huwa pprovdut fl-Appendiċi 7. Hija disponibbli informazzjoni ta' sfond dwar l-ekoloġija tal-ispeċi ta' dud u l-użu f'ittestjar ekotossikoloġiku (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINĊIPJU TAT-TEST

3. In-nisa adulti huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta ma' hamrija. It-test jinbeda b'10 nisa adulti għal kull reċipjent ta' replikat. L-irġiel ma jgħux introdotti fit-test, peress li l-esperjenza wriet li n-nisa jgħammru immedjatament jew fit-twa li jfaqqsu mill-istadju ta' dewtonimfa, jekk ikun hemm l-irġiel. Barra minn hekk, l-inkluzjoni tal-irġiel, ittaqqas it-test b'tali mod li tkun meħtieġa diskriminazzjoni impenjattiva tal-istadji ta' etajiet. Għalhekk, it-tgħammir innifsu mhuwiex parti mit-test. In-nisa jgħu introdotti fit-test 28-35 jum wara l-bidu tal-perjodu ta' bidden fis-sinkronizzazzjoni (ara l-Appendiċi 4), peress in-nisa mbagħad jistgħu jgħu kkunsidrati bħala diġà mghammrin u li għaddew mill-istadju ta' qabel l-ovipożizzjoni. F'20 °C it-test jintemm fl-14-il jum wara l-introduzzjoni tan-nisa (jum 0), li jippermetti l-ewwel wild ta' kontroll jilhaq l-istadju ta' dewtonimfa (ara l-Appendiċi 4). Għall-varjabbli ewlieni mkejjeġ, jiġi ddeterminat in-numru ta' friegħ għal kull reċipjent tat-test flimkien man-numru ta' nisa li jibqgħu ħajjin. Il-produttjoni riproduttiva tad-dud espost għas-sustanza kimika tat-test titqabbel ma' dik tal-kontrolli sabiex tiġi ddeterminata l-EC_x (eż. EC₁₀, EC₅₀) jew il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet), skont id-disinn sperimentali (ara l-paragrafu 29). Farsa ġenerali tal-iskeda tal-ittestjar tingħata fl-Appendiċi 8.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. Preferibbilment għandhom ikunu magħrufa s-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow}, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma hamrija u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test. Hija rakkomandabbli informazzjoni addizzjonali dwar id-destin tas-sustanza kimika tat-test, bħar-rati ta' degradazzjoni bijotika u abjotika.
5. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jintuża għal sustanzi kimiċi li jinhallu fl-ilma jew li ma jinhallux fl-ilma. Madankollu, il-mod ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test sejjer ikun differenti skont dan. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-arja/ilma huwa ikbar minn wieħed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

▼ M6**VALIDITÀ TAT-TEST**

6. Il-kriterji li ġejjin għandhom jiġu stratifikati fil-kontrolli mhux ittrattati għal riżultat tat-test biex jitqies validu:

- Il-medja ta' mortalità tan-nisa adulti ma għandhiex taqbeż 1-20 % fi tmiem it-test;
- In-numru medju ta' frieh għal kull replikat (b'10 nisa adulti introdotti) għandu jkun tal-inqas 50 fi tmiem it-test;
- Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni kkalkolat għan-numru ta'dud frieh għal kull replikat ma għandux ikun oghla minn 30 % fi tmiem it-test finali.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

7. L-EC_x u/jew l-NOEC ta' sustanza kimika ta' referenza għandhom jiġu ddeterminati biex jipprovdu assigurazzjoni li l-kundizzjonijiet tat-test fil-laboratorju huma adegwati u biex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organizmi tat-test ma nbidilx maż-żmien. Dimethoate (CAS 60-51-5) huwa sustanza kimika ta' referenza xierqa li uriet li taffettwa d-daqs tal-popolazzjoni (4). L-aċidu boriku (CAS 10043-35-3) jista' jintuża bħala sustanza kimika ta' referenza alternattiva. Inkisbet inqas esperjenza b'din is-sustanza kimika. Huma possibbli żewġ opzjonijiet ta' disinn:

- Is-sustanza kimika ta' referenza tista' tiġi ttestjata b'mod parallel għad-determinazzjoni tat-tossicità ta' kull sustanza kimika tat-test f'koncentrazzjoni partikolari, li għandha tintwera qabel fi studju ta' rispons għad-doża biex tirriżulta f'effett ta' tnaqqis ta' > 50 % ta' wlied. F'dan il-każ, in-numru ta' repliki għandu jkun l-istess bħal dak tal-kontrolli (ara l-paragrafu 29).
- Inkella, is-sustanza kimika ta' referenza tiġi ttestjata bejn darba u darbtejn fis-sena f'test ta' rispons għad-doża. Skont id-disinn magħżul, in-numru ta' koncentrazzjonijiet u repliki u l-fattur ta' spazjar ivarjaw (ara l-paragrafu 29), iżda għandu jintlaħaq rispons ta' effett ta' 10 — 90 % (fattur ta' spazjar ta' 1,8). L-EC₅₀ għal dimetoat abbazi tan-numru ta' frieh għandha taqa' fil-medda bejn 3,0 u 7,0 mg a.s./kg ta' hamrija (piż xott). Abbazi tar-riżultati miksuba bl-aċidu boriku s'issa, l-EC₅₀ ibbażata fuq in-numru ta' frieh għandha taqa' fil-medda bejn 100 u 500 mg/kg ta' piż xott ta' hamrija.

DESKRIZZJONI TAT-TEST**Reċipjenti tat-test u tagħmir**

8. Għandhom jintużaw reċipjenti tat-test b'dijametru ta' 3 — 5 cm (għoli ta' hamrija ta' ≥ 1,5 cm), magħmula bil-ħġieġ jew materjal kimikament inert iehor u li għandhom għatu li jingħalaq sew. L-ghotjien bil-kamin huma ppreferuti u f'dak il-każ, ir-reċipjenti jistghu jiġu arjati darbtejn f'gimgha. Inkella, jistghu jintużaw ghotjien li jippermettu skambju gassuż dirett bejn is-sottostrat u l-atmosfera (eż. garża). Peress li l-kontenut ta' umdità għandu jinżamm għoli biżżejjed matul it-test, huwa essenzjali li jiġi kkontrollat il-piż ta' kull reċipjent sperimentali matul it-test u li jerga' jimtela bl-ilma jekk mehtieg. Dan jista' jkun speċjalment importanti jekk ma jkun disponibbli ebda ghotjien bil-kamin. Jekk jintuża reċipjent tat-test mhux trasparenti, l-għatu għandu jkun magħmul minn materjal li jippermetti l-aċċess għad-dawl (eż. permezz ta' għatu trasparenti mtaqqab) filwaqt li jevita li d-dud jahrab. Id-daqs u t-tip tar-reċipjent tat-test jiddependi fuq il-metodu tal-estrazzjoni (ara l-Appendiċi 5 għal dettalji). Jekk tiġi applikata estrazzjoni bis-shana lir-reċipjent tat-test, allura tista' tiżdied xibka tal-qiegh b'daqs ta' xibka xieraq (issigillata sal-estrazzjoni), u l-fond tal-hamrija għandu jkun suffiċjenti biex jippermetti gradjent tat-temperatura u l-umdità.

▼ M6

9. Huwa mehtieg tagħmir standard tal-laboratorju, speċifikament dan li ġej:

- preferibbilment reċipjenti tal-ħġieg b'għotjien bil-kamin;
- kabinett tat-tnixxif;
- sterjomikroskopju;
- xkupilji għat-trasferiment tad-dud
- miter tal-pH u luxmetru;
- imwieżen preċiżi xierqa;
- tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;
- tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni ikunu mghottija bl-għotjien);
- inkubatur jew kamra żgħira b'kontroll tat-temperatura;
- tagħmir għall-estrazzjoni (ara l-Appendiċi 5) (13)
- pannell tad-dawl fil-gholi b'kontroll tad-dawl
- vażetti tal-ġbir għad-dud estratt.

Preparazzjoni tal-hamrija artifiċjali

10. Għal dan it-test, tintuża hamrija artifiċjali. Il-hamrija artifiċjali tikkonsisti mill-komponenti li ġejjin (il-valuri kollha huma bbażati fuq il-massa xotta):

- 5 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u mithun irqiq (daqs tal-frak ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli);
- 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);
- madwar 74 % ramel industrijali mnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' CaCO_3 mehtieg), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron. L-ammont eżatt ta' ramel jiddependi fuq l-ammont ta' CaCO_3 (ara hawn taht), flimkien għandhom jagħmlu 75 %.
- < 1,0 % karbonat tal-kalċju (CaCO_3 , pulverizzat, grad analitiku) biex jinkiseb pH ta' $6,0 \pm 0,5$; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiddependi jiddependi prinċipalment fuq il-kwalità/natura tal-pit (ara Nota 1).

Nota 1: L-ammont ta' CaCO_3 mehtieg sejjer jiddependi fuq il-komponenti tas-sottostrat tal-hamrija u għandu jiġi ddeterminat billi jitkejjel il-pH tas-sottokampjuni tal-hamrija eżattament qabel it-test (14).

Nota 2: Il-kontenut ta' pit tal-hamrija artifiċjali jiddevja minn metodi ta' ttestjar fuq l-organizmi tal-hamrija, fejn fil-biċċa l-kbira tad-drabi jintuża 10 % pit (eż. (15)). Madankollu, skont l-EPPO (16), hamrija agrikola tipika ma għandhiex iktar minn 5 % tal-materja organika, u għalhekk it-tnaqqis fil-kontenut tal-pit jirrifletti t-tnaqqis fil-possibbiltajiet ta' hamrija naturali għal sorbiment tas-sustanza kimika tat-test mal-karbonju organiku.

Nota 3: Jekk ikun mehtieg, eż. għal finijiet ta' ttestjar speċifiċi, il-hamrijiet naturali minn siti mhux imniġġsa jaf iservu wkoll bhala sottostrat tal-ittestjar u/jew tal-kultura. Madankollu, jekk tintuża hamrija naturali, din għandha tiġi kkaratterizzata tal-inqas bl-orijini (sit tal-ġbir), il-pH, il-konsistenza (distribuzzjoni tad-daqs tal-frak) u l-kontenut ta' materja organika. Jekk ikun disponibbli, għandu jiġi inkluz it-tip u l-isem tal-hamrija skont il-klassifikazzjoni tal-hamrija, u l-hamrija ma għandu jkollha ebda kontaminazzjoni.

▼ M6

F'każ li s-sustanza kimika tat-test hija metall jew metall organiku, għandha tiġi ddeterminata l-kapaċità tal-iskambju katjoniku (CEC) tal-ħamrija naturali. Għandha tingħata attenzjoni speċjali biex jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità peress li l-informazzjoni ta' sfond dwar il-ħamriji naturali ġeneralment hija rari.

11. Il-kostitwenti xotti tal-ħamrija jithalltu sewwa (eż. f'mikser tal-laboratorju fuq skala kbira). Għad-determinazzjoni tal-pH, tintuża tahlita ta' ħamrija u 1 M klorur tal-potassju (KCl) jew 0,01 M soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju (CaCl_2) f'proporzjon ta' 1:5 (ara (14) u Appendiċi 3). Jekk il-ħamrija hija iktar aċidika mill-medda mehtieġa (ara l-paragrafu 10), tista' tiġi aġġustata biż-żieda ta' ammont xieraq ta' CaCO_3 . Jekk il-ħamrija hija alkalina wisq, din tista' tiġi aġġustata b'żieda ikbar tat-tahlita li tinkludi l-ewwel tliet komponenti deskritti fil-paragrafu 10, izda li teskludi s- CaCO_3 .
12. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) massima tal-ħamrija artifiċjali hija ddeterminata skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 2. Jumejn sa sebat ijiem qabel il-bidu tat-test, il-ħamrija artifiċjali xotta tixxarrab minn qabel biż-żieda ta' biżżejjed ilma distillat jew dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut ta' ilma finali, li huwa 40 sa 60 % tad-WHC massima. Il-kontenut ta' umdità huwa aġġustat għal 40-60 % tad-WHC massimu biż-żieda tas-soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test u/jew biż-żieda ta' ilma distillat jew dejonizzat (ara l-paragrafi 16-18). Verifika approssimattiva addizzjonali tal-kontenut ta' umdità fil-ħamrija għandha tinkiseb billi l-ħamrija tingħafas bil-mod fl-idejn, jekk il-kontenut ta' umdità jkun korrett, għandhom jidhru qtar żgħir tal-ilma bejn is-swaba'.
13. Il-kontenut ta' umdità fil-ħamrija huwa ddeterminat fil-bidu u fi tmiem it-test billi jitnixxef għal piż kostanti f'105 °C skont l-ISO 11465 (17) u l-pH tal-ħamrija skont l-Appendiċi 3 jew l-ISO 10390 (14). Dawn il-kejliet għandhom jitwettqu f'kampjuni addizzjonali mingħajr dud, kemm mill-ħamrija ta' kontroll kif ukoll minn kull waħda mill-ħamriji ta' konċentrazzjoni tat-test. Il-pH tal-ħamrija ma għandux jiġi aġġustat meta s-sustanzi kimiċi aċidużi jew bażiċi huma ttestjati. Il-kontenut ta' umdità għandu jiġi ssorveljat matul it-test billi r-reċipjenti jintiżnu kull ċertu żmien (ara l-paragrafi 20 u 24).

Għażla u preparazzjoni tal-annimali tat-test

14. L-ispeċi użata f'dan it-test hijia *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Biex jinbada t-test huwa mehtieġ dud nisa adult, miksub minn koorti sinkronizzata. Id-dud għandu jiġi introdott madwar 7-14-il jum wara li jsir adult, 28 — 35 jum wara l-bidu tat-tqegħid tal-bajd fis-sinkronizzazzjoni (ara l-paragrafu 3 u l-Appendiċi 4). Is-sors tad-dud jew il-fornitur u ż-żamma tal-kultura tal-laboratorju għandhom jiġu rreġistrati. Jekk tinzamm kultura tal-laboratorju, huwa rakkomandat li l-identità tal-ispeċi tiġi kkonfermata tal-inqas darba f'sena. Skeda ta' identifikazzjoni hija inkluzja bhala l-Appendiċi 6.

Preparazzjoni tal-konċentrazzjoni tat-test

15. Is-sustanza kimika tat-test tithallat fil-ħamrija. Is-solventi organiċi użati fit-trattament tal-ġajnuna tal-ħamrija bis-sustanza kimika tat-test abbażi tat-tossicità baxxa tagħhom għad-dud u kontroll tas-solventi xieraq għandhom jiġu inkluzi fid-disinn tat-test (ara l-paragrafu 29).

Sustanza kimika tat-test li tinħall fl-ilma

16. Tiġi ppreparata soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test filma dejonizzat f'kwantità suffiċjenti għar-repliki kollha ta' konċentrazzjoni tat-test waħda. Huwa rakkomandat li tintuża kwantità xierqa ta' ilma biex jintlaħaq il-kontenut ta' umdità mehtieġ, jiġifieri 40 sa 60 % tad-WHC massima (ara l-paragrafu 12). Kull soluzzjoni ta' sustanza kimika tat-test tithawwad sew b'lott wieħed ta' ħamrija mxarrba minn qabel, qabel tiġi introdotta fir-reċipjent tat-test.

▼ **M6***Sustanza kimika tat-test li ma tinħallx fl-ilma*

17. Għal sustanzi kimiċi li ma jinhallux fl-ilma iżda li jinhallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinħall fl-iżgħar volum possibbli ta' veikolu xieraq (eż. aċetun). Għandhom jintużaw biss solventi volatili. Meta jintużaw tali veikoli, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha u l-kontroll għandu jkun fihom l-istess ammont tal-veikolu. Il-veikolu jiġi sprejat fuq ammont imħallat b'ammont żgħir, pereżempju 10 g, ta' ramel kwarzuż irqi. Il-kontenut totali ta' ramel tas-sottostrat għandu jiġi korrett għal dan l-ammont. Il-veikolu huwa eliminat bl-evaporazzjoni taht għata tad-dhahen għal tal-inqas siegħa. Din it-tahlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied mal-hamrija mxarrba minn qabel u tithawwad sew billi jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex tinkiseb l-umdità mehtieġa. It-tahlita finali tiġi introdotta fir-riċipjenti tat-test. Wiehed għandu jinnota li xi solventi jaf ikunu tossiċi għad-dud. Għalhekk, huwa rakkomandat li jintuża kontroll tal-ilma addizzjonali mingħajr veikolu jekk it-tossiċità tas-solvent għad-dud ma tkunx magħrufa. Jekk jintwera b'mod adegwat li s-solvent (fil-konċentrazzjonijiet li għandhom jiġu applikati) ma għandu ebda effett, il-kontroll tal-ilma jista' jiġi eskluż.

Sustanza kimika tat-test li ma tanx tinħall fl-ilma u solventi organiċi

18. Għal sustanzi kimiċi li ma tanx jinhallu fl-ilma u solventi organiċi, l-ekwivalent ta' 2,5 g ta' ramel kwarzuż mithun irqi f'kull riċipjent tat-test (pereżempju 10 g ta' ramel kwarzuż irqi għal erba' repliki) jithallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test biex tinkiseb il-konċentrazzjoni tat-test xierqa. Il-kontenut totali ta' ramel tas-sottostrat għandu jiġi korrett għal dan l-ammont. Din it-tahlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiżdied ma' hamrija mxarrba minn qabel u tithallat sew wara li jiżdied ammont xieraq ta' ilma dejonizzat biex jinkiseb il-kontenut ta' umdità mehtieġ. It-tahlita finali tinqasam bejn ir-riċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jiġi ppreparat ukoll kontroll xieraq.

PROCEDURA**Gruppi tat-test u kontrolli**

19. Huma rakkomandati għaxar nisa adulti f'massa xotta ta' 20 g ta' hamrija artifiċjali għal kull riċipjent ta' kontroll u ta' trattament. L-organizmi tat-test għandhom jiżdiedu fi żmien sagħtejn wara l-preparazzjoni tas-sottostrat finali tat-test (jiġifieri wara l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test). F'każijiet speċifiċi (eż. meta t-tixjiħ huwa kkunsidrat bħala fattur determinanti) il-hin bejn il-preparazzjoni tas-sottostrat tal-ittestjar finali u ż-żieda tad-dud jista' jittawwal (għal dettalji ta' tali tixjiħ, ara (18)). Madankollu, f'tali każijiet għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni xjentifika.
20. Wara ż-żieda tad-dud tal-ittestjar mal-hamrija, id-dud jiġi pprovdut bl-ikel u l-piż inizjali ta' kull riċipjent tat-test għandu jitkejjel biex jintuża bħala referenza għall-monitoraġġ tal-kontenut ta' umdità tal-hamrija matul it-test kif deskritt fil-paragrafu 24. Ir-riċipjenti tat-test imbagħad jitgħattew kif deskritt fil-paragrafu 8 u jitqieghdu fil-kompartiment tat-test.
21. Jiġu ppreparati kontrolli xierqa għal kull wiehed mill-metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test deskritti fil-paragrafi 15 sa 18. Il-proċeduri rilevanti deskritti huma segwiti għall-preparazzjoni tal-kontrolli hliet li s-sustanza kimika tat-test ma tiżdiedx. Għalhekk, fejn ikun xieraq, is-solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż jew veikoli oħra jiġu applikati mal-kontrolli f'konċentrazzjonijiet/ammonti bħal fit-trattamenti. Fejn jintuża solvent jew veikolu iehor biex tiżdied is-sustanza kimika tat-test, għandu jiġi ppreparat u ttestjat ukoll kontroll addizzjonali mingħajr il-veikolu jew is-sustanza kimika tat-test f'każ li t-tossiċità tas-solvent ma tkunx magħrufa (ara l-paragrafu 17).

▼ **M6****Kundizzjonijiet tat-test**

22. It-temperatura tat-test għandha tkun ta' 20 ± 2 °C. It-temperatura għandha tiġi rreġistrata tal-inqas kuljum u jekk ikun meħtieġ tiġi aġġustata. It-test jitwettagħ f'cikli ta' dawl u dlam ikkontrollati (preferibbilment 16-il siegħa dawl u 8 siegħat dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux qrib ir-reċipjenti tat-test. Għal raġunijiet ta' tqabbil, dawn il-kundizzjonijiet huma l-istess bħal f'testijiet ekotossikoloġiċi tal-hamrija oħrajn (eż. (15)).
23. L-iskambju gassuż għandu jiġi ggarantit bl-arjazzjoni tar-reċipjenti tat-test tal-inqas darbtejn f'gimgha f'każ li jintużaw għotjien li jingħalqu bil-kamin. Jekk jintużaw għotjien b'garża, għandha tingħata attenzjoni speċjali għaż-żamma tal-kontenut ta' umdità tal-hamrija (ara l-paragrafi 8 u 24).
24. Il-kontenut tal-ilma tas-sottostrat tal-hamrija fir-reċipjenti tat-test jinżamm matul it-test kollu billi jintiżen u jekk ikun meħtieġ kull ċertu żmien ir-reċipjenti tat-test jerġgħu jissaqqu (eż. darba f'gimgha). It-telf huwa rifornit kif meħtieġ b'ilma dejonizzat. Il-kontenut ta' umdità matul it-test ma għandux ikun differenti b'aktar minn 10 % mill-valur tal-bidu.

Taghlif

25. Id-dud tal-ġobon (*Tyrophagus putrescentiae* (Schränk, 1781)) intwera li huwa sors ta' ikel xieraq. Kollemboli żgħar (eż. *Folsomia candida* Willem żgħar, 1902 jew *Onychiurus fimbriatus* (19), (20), enkitraeidi (eż. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) jew nematodi (eż. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) jistgħu jkunu xierqa wkoll (21). Huwa rakkomandat li l-ikel jiġi vverifikat qabel jintuża f'test. It-tip u l-ammont ta' ikel għandu jiggarantixxi numru adegwat ta' frieh sabiex jiġu ssodisfati l-kriterji ta' validità (paragrafu 6). Għall-għażla tal-priża, għandu jiġi kkunsidrat il-mod ta' azzjoni tal-oġġett tat-test (eż. akariċida tista' tkun tossika għad-dud tal-ikel ukoll, ara l-paragrafu 26).
26. Għandu jiġi pprovdut ikel *ad libitum* (jiġifieri kull darba ammont żgħir (ponta ta' spatula)). Għal dan il-ghan, jista' jintuża wkoll exhaustor b'gibda baxxa kif propost fit-test tal-kollemboli jew pinzell irqiq. Il-forniment ta' ikel fil-bidu tat-test u darbtejn sa tliet darbtejn fil-gimgha generalment sejjer ikun suffiċjenti. Meta l-oġġett tal-ittestjar jidher li huwa tossiku għall-priża, għandha tiġi kkunsidrata zieda fir-rata ta' taghlif mu/jew sors ta' ikel alternattiv.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

27. L-għarfien minn qabel tat-tossicità tas-sustanza kimika tat-test għandu jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa, eż. minn studji tas-sejba tal-medda. Meta jkun meħtieġ, jitwettagħ test tas-sejba tal-medda b'hames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fil-medda ta' 0,1 — 1 000 mg/kg ta' hamrija xotta, b'tal-inqas replikat wieħed għat-trattamenti u l-kontroll. Id-durata tat-test tas-sejba tal-medda huwa ta' 14-il jum, fejn wara tiġi ddeterminata l-mortalità tad-dud adult u n-numru ta' frieh. Idealment, il-medda ta' konċentrazzjoni fit-test finali għandha tintgħażel b'tali mod li tinkludi konċentrazzjonijiet li fihom huma affettwati n-numru ta' frieh filwaqt li l-ġenerazzjoni tal-ommijiet le. Madankollu, dan jaf' ma jkunx possibbli għal sustanzi kimiċi li jikkawżaw effetti letali jew kwazi letali f'konċentrazzjonijiet kwazi simili. Il-konċentrazzjoni ta' effetti (eż. EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀) u l-firxa ta' konċentrazzjonijiet, li għalihom l-effett tas-sustanza kimika għall-ittestjar hija ta' interess, għandhom ikunu "bracketed" bil-konċentrazzjonijiet inkluzi fit-test. Estrapolazzjoni ferm iktar baxxa mill-konċentrazzjoni l-iktar baxxa li taffettwa l-organizmi tat-test jew ikbar mill-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha ssir biss f'każijiet eċċezzjonali, u għandha tingħata spjegazzjoni shiha fir-rapport.

Disinn sperimentali*Testijiet ta' rispons għad-doża*

28. Huma proposti tliet disinji tat-test, abbażi tar-rakkomandazzjonijiet li jirriżultaw minn ring test iehor (Test tar-riproduzzjoni tal-enkitraeidi

▼ **M6**

(22)). L-adegwatezza ġenerali ta' dawn id-disinji kollha kienet ikkonfermata mill-eżitu tal-validazzjoni ta' *H. aculeifer*.

29. Fl-istabbiliment tal-medda ta' konċentrazzjonijiet, wieħed għandu jżomm f'moħħu dan li ġej:

- Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC₁₀, EC₅₀), għandhom jiġu ttestjati tnax-il konċentrazzjoni. Huma rakkomandati tal-inqas żewġ repliki għal kull konċentrazzjoni u sitt repliki ta' kontroll. Il-fattur speċifiku jista' jvarja, jiġifieri ugwali għal 1,8 jew inqas minnu fil-medda tal-effett mistennija u iktar minn 1,8 fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet.
- Għad-determinazzjoni tal-NOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas hames konċentrazzjonijiet f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbix 2,0.
- Approċċ ikkombinat jippermetti d-determinazzjoni kemm tal-NOEC kif ukoll tal-EC_x. Għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet ta' trattament f'serje ġeometrika. Huma rakkomandati erba' repliki għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiġu spazjati b'fattur li ma jaqbix 1,8.

Test tal-limitu

30. Jekk ma jiġu osservati ebda effetti fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test tas-sejba tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg ta' piż xott tal-ħamrija), it-test tar-riproduzzjoni finali jitwettaq bħala test tal-limitu, permezz ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg ta' piż xott tal-ħamrija. Test tal-limitu sejjer jipprovi l-opportunità biex juri li l-NOEC jew l-EC₁₀ għar-riproduzzjoni hija ikbar mill-konċentrazzjoni tal-limitu filwaqt li jitnaqqas in-numru ta' dud użat fit-test. Għandhom jintużaw tmien repliki kemm għall-ħamrija ttrattata kif ukoll il-kontroll.

Durata u kejl tat-test

31. Għandha tiġi rreġistrata kwalunkwe differenza osservata fl-imġiba u l-morfoloġija tad-dud fil-kontroll u r-riċipjenti ttrattati.
32. Fl-14-il jum id-dud li baqa' ħaj jiġi estratt mill-ħamrija permezz ta' estrazzjoni bis-šana/dawl jew b'metodu xieraq ieħor (ara l-Appendiċi 5). In-numru ta' frieh (jiġifieri larvi, protonimfi u dewtonimfi) u adulti jingħaddu separatament. Kwalunkwe dudu rriq li ma jinstabx f'dan il-ħin għandu jiġi rreġistrat bħala mejjet, peress li wieħed jassumi li tali dud miet u ddekompona qabel il-valutazzjoni. L-effiċjenza tal-estrazzjoni għandha tkun ivvalidata darba jew darbtejn f'sena fil-kontrolli b'numru magħruf ta' adulti u frieh. L-effiċjenza għandha tkun iktar minn 90 % bħala medja kkombinata għall-istadji tal-iżvilupp kollha (ara l-Appendiċi 5). L-ghadd ta' adulti u frieh mhumix aġġustati għall-effiċjenza.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

33. Informazzjoni dwar il-metodi statistiċi li jistgħu jintużaw għall-analiżi tar-riżultati tal-ittestjar tingħata fil-paragrafi 36 sa 41. Barra minn hekk, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument 54 tal-OECD dwar l-“Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotożiżi: Gwida għall-Applikazzjoni” (31).
34. Il-punt ta' tmien ewlieni tat-test hija l-produzzjoni riproduttiva, hawnhekk in-numru ta' frieh prodotti f'kull riċipjent tat-test tar-replikat (b'10 nisa adulti introdotti). L-analiżi statistika teħtieġ il-medja aritmetika (X) u l-varjanza

▼ **M6**

(s^2) għall-produzzjoni riproduttiva li għandha tiġi kkalkolata għal kull trattament u għal kull kontroll. X u s^2 jintużaw għall-proċeduri ANOVA bħat-test t tal-Istudent, it-test ta' Dunnett, jew it-test ta' Williams kif ukoll għall-kalkolu ta' intervalli ta' kunfidenza ta' 95 %.

Nota: Dan il-punt ta' tmiem ewlieni huwa ekwivalenti għall-fekondità mkejla bħala n -numru ta' frieh hajjin prodotti matul it-test diviż min-numru ta' nisa parentali introdotti fil-bidu tat-test.

35. In-numru ta' nisa li baqgħu hajjin fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità ewlieni u għandu jiġi ddokumentat. Bhal fit-test tas-sejba tal-medda, is-sinjali ta' hsara l-oħra kollha għandhom jiġu rreġistrati fir-rapport finali wkoll.

EC_x

36. Il-valuri EC_x inkluz il-limiti ta' kunfidenza baxxi u superjuri assoċjati tagħhom ta' 95 % għall-parametru deskritt fil-paragrafu 34 huma kkalkolati permezz ta' metodi statistiċi xierqa (eż. analiżi probit, funzjoni logistika jew Weibull, metodu Spearman-Kärber trimmjat jew interpolazzjoni sempliċi). EC_x tinkiseb billi jiddaħhal valur korrispondenti għal x % tal-medja ta' kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC₅₀ jew kwalunkwe EC_x, il-medji għal kull trattament (x) għandhom ikunu soġġetti għal analiżi tar-rigressjoni.

NOEC/LOEC

37. Jekk analiżi statistika hija maħsuba biex tistabbilixxi l-NOEC/LOEC, hija meħtieġa statistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu repliki). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa (skont id-Dokument tal-OECD 54 dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta Ekotossika: Gwida għall-Applikazzjoni). B'mod ġenerali, l-effetti avversi tal-oġġetti tal-ittestjar meta mqabbel mal-kontroll huma investigati permezz ta' ttestjar tal-ipoteżijiet (iżghar) bi tmiem wiehed $p \leq 0,05$. Eżempji jingħataw fil-paragrafi li ġejjin.
38. Id-distribuzzjoni normali tad-dejta tista' tiġi ttestjata eż. bit-test tat-tjubija tal-adattament ta' Kolmogorov-Smirnov, it-Test tal-proporzjon tad-devjazzjoni tal-medda mill-istandard (R/s -test) jew it-test Shapiro-Wilk (żewġ naħat, $p \leq 0,05$). Biex tiġi ttestjata l-varjanza tal-omoġenità jistgħu jintużaw it-test ta' Cochran, it-test ta' Levene jew it-test ta' Bartlett, (b'żewġ naħat, ($p \leq 0,05$)). Jekk il-prerekwiżiti tal-proċeduri tal-ittestjar parametru (in-normalità, l-omoġenità tal-varjanza) jiġu ssodisfati, tista' titwettagħ Analizi tal-Varjanza (ANOVA) b'Direzzjoni waħda u testijiet ta' tqabbil b'diversi paraguni sussegwenti. Paraguni multipli (eż. test- t ta' Dunnett) jew testijiet ta' tendenza rigressiva (eż. test ta' Williams fil-każ ta' relazzjoni monotona bejn id-doża u r -rispons) jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi sinifikanti ($p \leq 0,05$) bejn il-kontrolli u d-diversi konċentrazzjonijiet tal-oġġetti tal-ittestjar (l-għażla tat-test rakkomandat skont id-Dokument tal-OECD 54 dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossicità: Gwida għall-Applikazzjoni). Inkella, għandhom jintużaw metodi mhux parametru (eż. it-test- U ta' Bonferroni skont it-test ta' tendenza ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) biex jiġu ddeterminati l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

39. Jekk jitwettagħ test tal-limitu (tqabbil tal-kontroll u trattament wiehed biss) u jiġu ssodisfati l-prerekwiżiti tal-proċeduri tat-test parametru (in-normalità, l-omoġenità), ir-risponsi metriċi jistgħu jiġu evalwati mit-Test ta' Student (test- t). Jista' jintuża test- t tal-varjanza mhux uguali (test- t ta' Welch) jew test mhux parametru, bħat-test- U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati.
40. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistgħu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi

▼ M6

sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistghu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Rapport tat-test

41. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi tal-inqas l-informazzjoni li ġejja:

— *Sustanza kimika tat-test*

- l-identità tas-sustanza kimika tat-test, l-isem, il-lott, in-numru tal-lott u CAS, il-purità;
- il-proprietajiet fizikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log K_{ow} , is-solubilità fl-ilma, il-pressure tal-fwar, il-kostanti ta' Henry (H) u idealment informazzjoni fuq l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija).

— *Organizmi tat-test*

- identifikazzjoni u fornitur tal-organizmi tal-ittestjar, deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tal-kulturi;
- medda ta' etajiet tal-organizmi tal-ittestjar.

— *Kundizzjonijiet tat-test*

- deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura sperimentali;
- dettalji tal-preparazzjoni għall-hamrija tal-ittestjar; speċifikazzjoni ddettaljata jekk tintuża hamrija naturali (origini, storja, distribuzzjoni tad-daqs tal-frek, pH, kontenut tal-materja organika u jekk tkun disponibbli l-klassifikazzjoni tal-hamrija)
- il-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-hamrija;
- deskrizzjoni tat-teknika użata biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test lill-hamrija;
- dettalji tas-sustanzi kimiċi awżiljari użati għall-ghoti tas-sustanza kimika tat-test;
- id-daqs tar-riċipjenti tat-test u l-massa xotta tal-hamrija tat-test għal kull riċipjent;
- kundizzjonijiet tat-test: intensità tad-dawl, durata taċ-ċikli tad-dawl u d-dlam, it-temperatura;
- deskrizzjoni tar-reġim ta' tagħlif, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati ta' tagħlif;
- il-pH u l-kontenut tal-ilma tal-hamrija fil-bidu u matul it-test (kontroll u kull trattament)
- deskrizzjoni ddettaljata tal-metodu ta' estrazzjoni l-effiċjenza tal-estrazzjoni.

— *Riżultati tat-test*

- in-numru ta' frieh iddeterminat f'kull riċipjent tat-test fi tmiem it-test;
- in-numru ta' nisa adulti u l-mortalità tal-adulti (%) f'kull riċipjent tat-test fi tmiem it-test
- deskrizzjoni tas-sintomi ovvji jew bidliet distinti fl-imġiba;
- ir-riżultati miksba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;
- statistika fil-qosor (EC_x u/jew NOEC) inkluż limiti ta' kunfidenza ta' 95 % u deskrizzjoni tal-metodu tal-kalkolu;

▼ M6

- plott tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons;
- devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test.

LETTERATURA

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS — Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition. Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.
- (8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.
- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römcke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: *Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils*. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. *Zool. Beiträge*, 34, 395-433.
- (11) 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. N.F.* 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). *Environmental Science & Technology* 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. *Natura Jutlandica* 20, 95-122.
- (14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). *Soil Quality — Determination of pH*, No. 10390. ISO, Geneva.

▼ **M6**

- (15) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness -. Toxicity for Earthworms..
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collembola). Ges.allg. angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Il-Kapitolu C.32 ta' dan l-Anness- Test tar-riproduzzjoni tal-enkitraedi.
- (23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with “good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Polonica 24, 11-59.
- (30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.
- (31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar (f'dan it-test il-konċentrazzjonijiet tal-effetti kollha huma espressi bħala massa tas-sustanza kimika tat-test skont il-massa xotta tal-hamrija tat-test):

Sustanza kimika tfisser sustanza jew tahlita

NOEC (konċentrazzjoni bla effett osservat) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fejn mhuwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

LOEC (il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) f'perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

EC_x (konċentrazzjoni tal-effett għal effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża effett ta' x % fuq l-organizmi tat-test f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC₅₀ hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

Sustanza Kimika tat-Test hija sustanza jew tahlita ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ **M6***Appendiċi 2***Determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma tal-ilma massima tal-hamrija**

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-kapaċità ta' żamma massima tal-ilma tal-hamrija huwa kkunsidrat bħala xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (Kwalità tal-Hamrija — Effetti tas-sustanzi li jniġġsu fuq il-hniex (*Eisenia fetida*). Parti 2: Determinazzjoni tal-effetti fuq ir-riproduzzjoni (23)).

Igbor kwantità ddefinita (eż. 5 g) tas-sottostrat tal-hamrija tal-ittestjar permezz ta' apparat ta' kampjunar xieraq (tubu tal-auger eċċ.). Għatti l-qiegħ tat-tubu b'biċċa karta filtru mimlija bl-ilma u mbagħad qiegħda fuq xtelliera f'banjumarija. It-tubu għandu jiddahhal gradwalment sakemm il-livell tal-ilma jkun iktar mill-parti ta' fuq tal-hamrija. Imbagħad għandu jithalla fl-ilma għal madwar tliet sigħat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-hamrija jista' jinzamm, il-kampjun tal-hamrija għandu jithalla jitbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi tpogġi t-tubu fuq saff ta' ramel kwarzuz mithun irqiq, imxarrab hafna ġewwa reċipjent mghotti (biex jiġi evitat li jinxf). Il-kampjun għandu mbagħad jintizen, jitnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapaċità ta' żamma tal-ilma (WHC) imbagħad tista' tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f' \% ta' massa xotta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa xotta tas-sottostrat

▼ M6*Appendiċi 3***Determinazzjoni tal-pH tal-hamrija**

Il-metodu li ġej għad-determinazzjoni tal-pH tal-hamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija f'ISO DIS 10390: Kwalità tal-Hamrija — Determinazzjoni tal-pH (16).

Kwantità ddefinita ta' hamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-hamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' hamrija) f'hames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalċju ta' grad analitiku (CaCl₂). Is-sospensjoni mbagħad tithallat sew għal hames minuti u mbagħad tithalla toqgħod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Il-pH tal-fażi likwida mbagħad jitkejjel permezz ta' miter tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl permezz ta' serje xierqa ta' soluzzjonijiet tal-bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

▼ M6

Appendiċi 4

Trobbija ta' (*Geolaelaps*) *aculeifer*, dud tal-ikel u sinkronizzazzjoni tal-kultura**Trobbija ta' *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*:**

Il-kulturi jistgħu jinżammu f'reċipjenti tal-plastik jew vażetti tal-ħġieġ mimlija b'tahlita (9:1) ta' plaster bil-ġibs ta' Paris / trab tal-faħam. Il-ġibs jista' jinżamm umdu billi jiżdiedu ftit qtar ta' ilma distillat jew dejonizzat jekk ikun meħtieġ. It-temperaturi tat-trobbija huma ottimali bejn 20 ± 2 °C, reġim fid-dawl / dlam mhuwiex rilevanti għal din l-ispeċi. Il-priża tista' tkun dud *Tyrophagus putrescentiae* jew *Caloglyphus* sp.(id-dud tal-ikel għandu jiġi mmanigġjat b'attenzjoni peress li jista' jikkawża allergiji fil-bnedmin), iżda nematodi, enkitraeidi u kollembolani huma adattati wkoll bħala priża. Is-sors tagħhom għandu jiġi reġistrat. L-iżvilupp tal-popolazzjoni jista' jibda b'mara waħda peress li l-irġiel jiżviluppaw f'bajd mhux fertilizzat. Il-ġenerazzjonijiet jikkoinċidu hafna. Mara tista' tgħix tal-inqas 100 jum u tista' tbid madwar 100 bajda matul il-ħajja tagħha. Rata ta' bidien massima tintlaħaq bejn l-10 u l-40 jum (wara li jsiru adulti) u tammonta għal $2,2$ nisa tal-bajd⁻¹ jum⁻¹. Iż-żmien ta' żvilupp minn bajda għal mara adulta huwa madwar 20 jum f'20 °C. Iktar minn kultura waħda għandha tiġi tinzamm minn qabel.

Trobbija ta' *Tyrophagus putrescentiae*:

Id-dud jinżamm f'reċipjent tal-ħġieġ mimli bi trab irqiġ tal-ħmira tal-birrierji li jitqiegħed f'barmil tal-plastik mimli b'soluzzjoni KNO₃ sabiex jiġi evitat li jahrab. Id-dud tal-ikel jitqiegħed fuq wiċċ dan it-trab. Wara, jithallat b'attenzjoni mat-trab (li għandu jitbiddel darbtejn fil-ġimgha) permezz ta' spatula.

Sinkronizzazzjoni tal-kultura:

Il-kampjuni li jintużaw fit-test għandhom ikunu tal-istess età (ca. 7 ijiem wara l-ilħuq tal-istadju adult). F'temperatura ta' trobbija ta' 20 °C, din tintlaħaq billi

Ittasferixxi n-nisa lejn reċipjent tat-trobbija u zid bizzejjed ikel

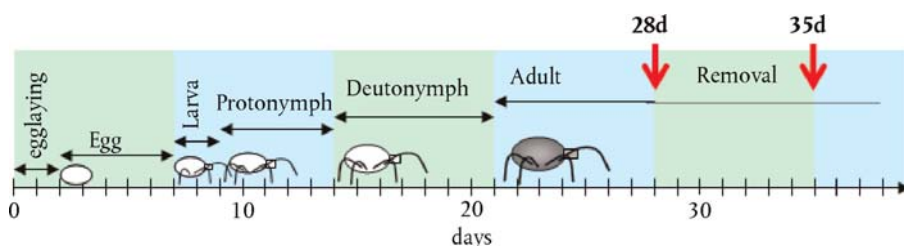
— Halli jumejn sa tliet ijiem għall-bidien tal-bajd, nehhi n-nisa

— Hu n-nisa adulti għall-ittestjar bejn it-28 u l-35 jum wara li tibda tqiegħed l-adulti nisa f'reċipjenti ta' trobbija nodfa.

In-nisa adulti jistgħu jintgħarfu faċilment mill-irġiel u stadji ta' żvilupp oħra mid-daqs ikbar, il-forma minfuħa u t-tarka dorsali kannella tagħhom (l-irġiel huma irqaq u ċatti), in-nisa immaturi jkunu bojod għal kulur il-krema. L-iżvilupp tad-dud isegwi bejn wieħed u iehor il-mudell deskritt hawn taht f'20 °C (figura): Bajda 5 ijiem, Larva jumejn, Protonimfa 5 ijiem, Dewtonimfa 7 ijiem, perjodu ta' qabel il-bidien tal-mara jumejn. Wara, id-dud isir adult.

Figura

Żvilupp ta' *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* f'20 °C. (tnehhija = nisa użati għat-test)



▼ **M6**

L-annimali tal-ittestjar adulti jitnehhew mill-kultura sinkronizzata u introdotti fir-reċipjenti tat-test bejn it-28 u l-35 jum wara li l-nisa ġenituri jkunu bdew ibidu l-bajd (jigifieri 7 — 14-il jum wara li saru adulti). Dan jiżgura li l-annimali tal-ittestjar diġà jkunu għaddew mill-perjodu ta' preovipożizzjoni u tghammru ma' rġiel li diġà jinsabu fir-reċipjent tal-kultura. Osservazzjonijiet fil-kulturi tal-laboratorju jissuġġerixxu li n-nisa jitghammru eżatt jew ftit wara li jsiru adulti jekk ikun hemm l-irġiel (Ruf, Vaninnen, pers. obs.). Il-perjodu ta' sebat ijiem jint-ghażel biex jiffaċilita l-integrazzjoni fir-rutina tal-laboratorju u biex joffri protezzjoni kontra l-varjabbiltà tal-iżvilupp individwali fost id-dud. Il-bidien għandu jinbeda b'tal-inqas l-istess numru ta' nisa li huma eventwalment mehtieġa għat-test (Jekk pereżempju jkunu mehtieġa 400 mara fit-test, tal-inqas 400 mara għandhom jithallew ibidu l-bajd għal minn jumejn sa tlett ijiem. Tal-inqas 1 200 bajda għandhom ikunu l-punt ta' bidu għall-popolazzjoni sinkronizzata (proporzjon tas-sess madwar 0,5, mortalità madwar 0,2). Biex jiġi evitat il-kannibalizmu, huwa iktar fattibbli li ma jinżammux iktar minn 20-30 mara li jbidu l-bajd f'reċipjent wieħed.

▼ **M6***Appendiċi 5***Metodi ta' estrazzjoni**

Għal mikroartropodi, estrazzjoni bis-shana hija metodu xieraq għal kampjuni separati mill-hamrija / sottostrat (ara l-figura ta' hawn taht). Il-metodu huwa bbażat fuq l-attività tal-organizmi, b'hekk il-kampjuni mobbli biss sejjer ikollhom il-possibbiltà li jiġu rreġistrati. Il-prinċipju tal-estraxxjoni bis-shana huwa li jagħmel l-kundizzjonijiet għall-organizmi gradwalment aghar fil-kampjun, biex b'hekk jitolqu mis-sottostrat u jaqgħu f'likwidu ta' ffixsar (eż. etanol). Il-punti kruċjali huma d-durata tal-estraxxjoni u l-gradjent ta' kundizzjonijiet tajbin sa moderati sa hżiena għall-organizmi. Id-durata tal-estraxxjoni għat-testijiet ekotos-sikologiċi għandha tkun kemm jista' jkun qasira, peress li kwalunkwe tkabbir fil-popolazzjoni matul il-hin tal-estraxxjoni jiffalsifika r-riżultati. Min-naħa l-oħra, it-temperatura u l-kundizzjonijiet ta' umdità fil-kampjun għandhom dejjem ikunu f'medda li thalli lid-dud jiċċaqlaq. It-tishin ta' kampjun tal-hamrija jwassal għat-tnixxif ta' sottostrat. Jekk it-tnixxif ikun rapidu wisq, xi dud jaf ukoll jinxf qabel ikun imexxilu jahrab.

Għalhekk, hija proposta l-proċedura li ġejja (24) (25):

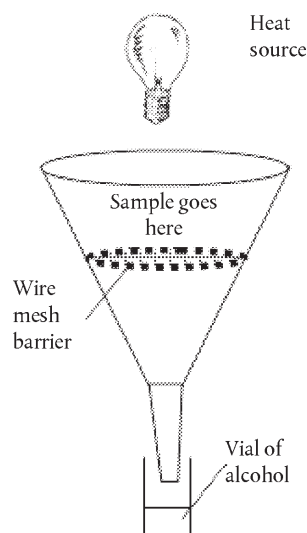
Apparat: Lembut Tullgren jew metodi paragonabbli bħal eż. McFadyen (tishin minn fuq, il-kampjun jitpoġġa fuq lembut)

Reġim ta' tishin: 25 °C għal 12-il siegħa, 35 °C għal 12-il siegħa, 45 °C għal 24 siegħa (total ta' 48 siegħa). It-temperatura għandha titkejjel fis-sottostrat.

Likwidu ta' ffixsar: 70 % etanol

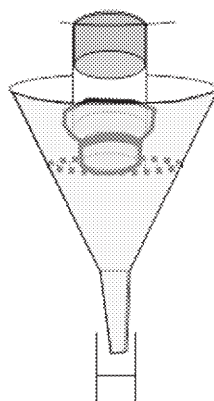
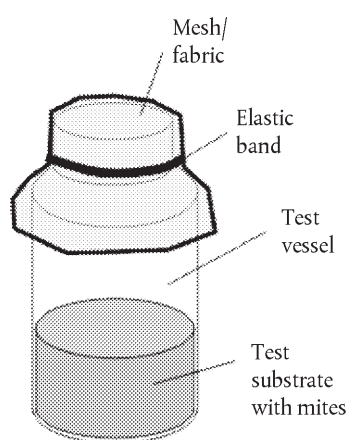
Dettalji: Hu l-kunjett tal-ħġieg li ntuża għat-test. Nehhi l-għatu u dawwar biċċa xibka jew drapp madwar il-ftuh. It-tessut għandu jkollu daqs tax-xibka ta' 1,00 sa 1,5 mm. Wahhal id-drapp b'lasktuwa. Bil-mod dawwar il-kunjett rasu 'l isfel u qiegħdu fl-apparat tal-estraxxjoni. It-tessut iwaqqaf is-sottostrat milli joqgħod iqattar fil-likwidu ta' ffixsar iżda jippermetti lid-dud jitlaq mill-kampjun. Ibda r-reġim ta' tishin wara li tkun dahhalt il-kunjetti kollha. Temm l-estraxxjoni wara 48 siegħa. Nehhi l-kunjetti ta' ffixsar u għodd id-dud permezz ta' mikroskopju tat-tnixxif.

L-effiċjenza fl-estraxxjoni tal-metodu magħżul għandha tkun ġiet ipprova darba jew darbtejn fis-sena permezz tar-reċipjenti li jkun fihom numru magħruf ta' frieh u dud adult miżmuma f'sottostrat tat-test mhux ittrattat. L-effiċjenza għandha tkun ≥ 90 % mill-medja kkombinata għall-istadji tal-iżvilupp kollha.

Apparat ta' estraxxjoni tat-tip Tullgren

▼ M6

Kif tipprepara l-kunjett tat-test wara li jintemm it-test, qabel l-estrazzjoni



▼ **M6**

Appendiċi 6

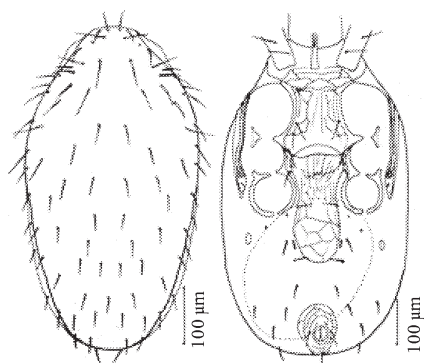
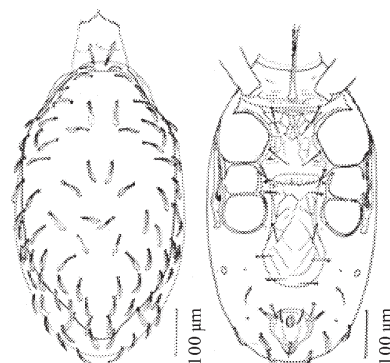
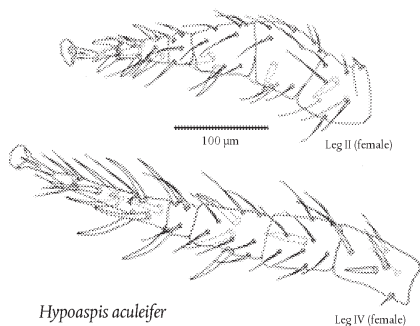
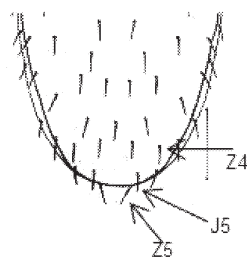
Identifikazzjoni ta' Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Sottoklassi/ordni/sotto-ordni:	Familja:	Gene/sottoġene/specji:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>

Awtur u Data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 January 2007

Letteratura użata:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400pp. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.

Karatteristiċi deterministiċi:	Tektum b'tarf tas-snin tond; skanalaturi ipostomali b'iktar minn 6 snin zgħar; setae dorsali tad-denb ta' Z4 mhux twil hafna; setae setiform dorsali; kisi ġenitali normali, mhux imkabbar hafna u li ma jilhaqx il-kisja anali; nofs ta' wara tal-kisja dorsali minghajr setae mhux abbinati; saqajn II u IV b'xi macrosetae hoxnin; seta dorsali Z5 madwar darbtejn itwal minn J5; numru fiss ta' chelicera bi 12-14-il sinna u numru mobbli b'2 sinniet; Idiosoma b'tul ta' 520-685 µm. <i>Hypoaspis miles</i> jintuża wkoll fil-kontroll bijologiku u jista' jithawwad ma' <i>H. aculeifer</i>. Id-differenza ewlenija hija: <i>H. miles</i> jagħmel parti mis-sottoġeneru <i>Cosmolaelaps</i> u għandu setae dorsali qisu sikkina filwaqt li <i>H. aculeifer</i> jagħmel parti mis-sottoġeneru <i>Geolaelaps</i> u għandu setae dorsali setiform.

*Hypoaspis aculeifer* Wara Hughes, 1976*Hypoaspis miles* Wara Hughes, 1976*Hypoaspis aculeifer*
Tipingijiet oriġinali ta' F. Faraji*Hypoaspis aculeifer*,
tarka dorsali b'setas karatteristiċi

▼ M6

Appendiċi 7

Informazzjoni bażika dwar il-bijoloġija ta' *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer jagħmel parti mill-familja Lealipidae, ordni Acari (dud), klassi Arachnida, tribù Arthropoda. Dawn jgħixu f'kull tip ta' hamrija u jieklu dud ieħor, nematodi, enkitraedi u kollembolani (26). F'każ ta' nuqqas ta' ikel, dawn jeqilbu għall-kannibalizmu (27). Id-dud predatorju jitqassam f'segmenti f'idiosoma u gnatosoma. Distinzjoni ċara bejn idjosoma fil-prosoma (ras) u opistosoma (addome) ma teżistix. Il-gnatosoma (kisja tar-ras) fiha l-istrumenti għat-tagħlif bħal palps u chelicera. Il-chelicers jitqassmu fi tliet partijiet u jkollhom snin twal bil-ponta b'għamliet differenti. Minbarra l-ingestjoni, l-irġiel jużaw il-chelicers tagħhom prinċipalment biex jitransferixxu l-ispermatofori lin-nisa. Kisja dorsali tkopri kważi kompletament l-idjosoma. Parti kbira mill-idiosoma tal-mara hija okkupata mill-organi riproduttivi, li huma b'mod partikolari evidenti f'it qabel ma jbidu l-bajd. Fuq iż-żaqq, jistgħu jinstabu żewġ kisjiet, il-kisja sternali u dik ġenitali. Is-saqajn kollha jiġu pprovduti b'lanżit u xewk. Il-lanżit jintuża biex ikunu jistgħu jehlu meta jimxu fuq wiċċ il-hamrija jew go fiha. L-ewwel par saqajn jużawhom prinċipalment bħala antenni. It-tieni par saqajn ma jużawhomx biss biex jiċċaqalqu iżda anki biex jifgħu l-priza. Ix-xewk tar-raba' par jista' jservi bħala protezzjoni kif ukoll "mutur għaċ-ċaqliq" (28). L-irġiel huma twal 0,55 — 0,65 mm u jiżnu 10 — 15 µg. In-nisa huma twal 0,8 — 0,9 mm u jiżnu 50 — 60 µg (8) (28) (Fig 1).

Fig. 1

In-nisa, l-irġiel, il-protonimfa u l-larvi ta' *H. aculeifer*.



F'23 °C, id-dud isir sesswalment matur wara 16-il jum (nisa) u 18-il jum (irġiel), rispettivament (6). In-nisa jgħorru l-isperma fis-solenostom fejn imbagħad sejrini jiġu ttrasferiti lejn l-ovar. Fl-ovar l-isperma timmatura u sejrini jinħażnu. Il-fertilizzazzjoni ssir biss wara l-maturazzjoni tal-isperma fl-ovar. In-nisa sejrini ibidu l-bajd fertilizzat jew mhux fertilizzat f'ċapep jew b'mod separat, preferibbilment fi xquq jew toqob. In-nisa li għaddew minn kopulazzjoni jistgħu jgħorru frieh taż-żewġ sessi, filwaqt li minn bajd tan-nisa li ma għaddewx minn kopulazzjoni sejrini ifaqqsu frieh irġiel biss. Biex isiru adulti, dawn iridu jgħaddu minn erba' fazzjiet (bajda — larva, larva — protonimfa, protonimfa — dewtonimfa, dewtonimfa — adult).

Il-bajda tkun ta' kulur abjad bħall-halib, ijalina, ellissa u b'tul ta' madwar 0,37 mm b'mantell solidu. Skont (8), il-larvi għandhom daqs ta' bejn 0,42 — 0,45 mm. Dawn għandhom biss tliet pari saqajn. Fil-parti tar-ras, jiżviluppaw chelicers u palps. Il-chelicers, li jkollhom xi f'it snin zghar (denticles), jintużaw biex ikunu jistgħu johorgu mill-bajda. Wara l-ewwel tqaxxir, bejn jum u jumejn wara t-tfaqqis, jiġu żviluppati l-protonymphs. Dawn huma bojod ukoll, b'daqs ta' 0,45

▼ M6

— 0,62 mm (8) u għandhom erba' pari saqajn. Fuq il-chelicers, is-snin ikunu jidhru kompletament. Meta jinghata bidu għal dan l-istadju, id-dud jibda jagħlef. Għal din ir-raġuni l-kutikula tal-priża tittaqqaq bil-chelicers u tiddaħħal sekrezzjoni għal diġestjoni intestinali żejda fil-priża. Il-maxx tal-ikel tista' mbagħad tiġi mirdugħa mid-dudu. Il-chelicers jistgħu jintużaw ukoll biex jitqatgħu frak ikbar minn biċċiet tal-ikel (28). Wara tqaxxir ieħor, jiġu żviluppati d-dewtonimfi. Dawn ikollhom daqs ta' 0,60 — 0,80 mm (8) u b'kulur isfar għal kannella ċar. Meta jinghata bidu għal din il-fażi, dawn jistgħu jiġu separati f'nisa u rġiel. Wara tqaxxir ieħor, li matulu l-annimali huma inattivi u tkun qiegħda tiżviluppa l-kisja kannella (wara madwar 14-il jum), id-dud isir adult (28) (29) (30). It-tul ta' hajja tagħhom huwa bejn 48 u 100 jum f'25 °C (27).

▼ **M6**

Appendiċi 8

Sommarju u skeda taż-żmien tal-azzjonijiet ewlenin li għandhom jittiehdu sabiex jitwettag it-test ta' Hypoaspis

Żmien (jiem) bidu tat-test = jum 0	Attività / komputu
Jum – 35 sa – 28	Ittrasferixxi n-nisa mill-kultura ewlenija lejn reċipjenti nodfa biex tibda s-sinkronizzazzjoni jumejn wara: nehhi n-nisa darbtejn jew tliet darbiet fil-gimgha: fornihom b'bizzzejjed ikel
Jum – 5 (+/- 2)	Ipprepara l-ħamrija artifiċjali
Jum – 4 (+/- 2)	Iddetermina d-WHC tal-ħamrija artifiċjali Nixxef mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kampjuni u kkalkola d-WHC
Jum – 4 (+/- 2)	Xarrab minn qabel il-ħamrija artifiċjali biex tilhaq 20 — 30 % ta' WHC
Jum 0	Ibda t-test: żid is-sustanza kimika tat-test mal-ħamrija artifiċjali Introduċi 10 nisa f'kull replikat Iżen kull replikat Stabbilixxi kontrolli abjotiċi għall-kontenut ta' umdità u l-pH, 2 repliki għal kull trattament Nixxef il-kontrolli tal-umdità mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kontrolli tal-umdità Il-jum li jmiss: kejjel il-pH tal-kontrolli abjotiċi mnixxfa
Jum 3, 6, 9, 12 (madwar)	Forni kull replikat b'ammont suffiċjenti ta' organiżmi tal-priża Iżen kull replikat u eventalment żid ilma evaporat
Jum 14	Spiċċa t-test, stabbilixxi l-estrazzjoni bir-repliki kollha flimkien mal-kontrolli tal-effiċjenza tal-estrazzjoni Nixxef il-kontrolli ta' kontenut ta' umdità mal-lejl Il-jum li jmiss: iżen il-kontrolli ta' kontenut ta' umdità Il-jum li jmiss: kejjel il-pH tal-kontrolli abjotiċi mnixxfa
Jum 16	Ittermina l-estrazzjoni
Jum 16 +	Irrregistra n-numru ta' adulti u frieh fil-materjal estratt Irrapporta r-riżultati fuq it-tabelli ta' mudell Irrapporta l-proċedura tal-ittestjar fl-iskedi tal-protokoll tat-test.

▼ M6

C.37. ASSAĠĠ FUQ 21 JUM TAL-HUT: SKRINJAR FUQ PERJODU QASIR GHAL ATTIVITÀ ESTROĠENIKA U ANDROĠENIKA, U INIBIZZJONI TAL-AROMATAŽI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 230 tal-OECD (2009). Il-htieġa li jiġi żviluppata u vvalidata assaġġ tal-hut li jkun jista' jidentifika ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali gejjja mit-tħassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkawżaw effetti avversi kemm fil-bnedmin kif ukoll fl-organizmi slavaġ minhabba l-interazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi mas-sistema endokrinali. Fl-1998, l-OECD bdiet attività ta' priyorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida eżistenti u tiżviluppata linja gwida godda għall-iskrinjar u l-ittestjar ta' sustanzi li potenzjalment ifixxlu s-sistema endokrinali. Element minnhom tal-attività kien li tiġi żviluppata Linja Gwida tat-Test għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali tal-ispeċi tal-hut. L-Assaġġ fuq 21 jum tal-Iskrinjar tas-Sistema Endokrinali tal-Hut għadda minn programm estensiv ta' validazzjoni li jikkonsisti fi studji interlaboratorji b'sustanzi kimiċi magħżula biex jintwerew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ fid-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estroġeniċi u li jinibixxu l-aromataži (1, 2, 3, 4, 5) fit-tliet speċijiet ta' hut investigati (il-karpjun buras, il-medaka Gappuniża u ż-żebra); id-detezzjoni ta' attività androġenika hija possibbli fil-karpjun buras u fil-medaka, iżda mhux fiż-żebra. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jippermettix id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi antiandroġeniċi. Il-hidma ta' validazzjoni giet riveduta permezz ta' evalwazzjoni bejn il-pari minn bord ta' esperti mahtura mill-Koordinaturi Nazzjonali tal-Programm tal-Linji Gwida tat-Test (6). L-assaġġ mhuwiex imfassal biex jidentifika mekkaniżmi speċifiċi ta' tfixkil ormonali peress li l-annimali tat-test għandhom assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali (HPG) intatta, li jista' jkollha rispons għal sustanzi kimiċi li għandhom impatt fuq l-assi HPG f'livelli differenti. L-assaġġ tar-Riproduzzjoni tal-Hut Fuq Żmien Qasir (TG 229 tal-OECD) jinkludi l-fekondità u, kif xieraq, l-istopatoloġija gonadali għall-karpjun buras, kif ukoll il-punti ta' tmiem kollha inkluzi f'dan il-metodu ta' ttestjar. It-TG 229 tal-OECD jipprovi skrinjar tas-sustanzi kimiċi li jaffettwaw ir-riproduzzjoni permezz ta' mekkaniżmi varji inkluzi l-modalitajiet endokrinali. Dan għandu jiġi kkunsidrat qabel ma jintagħżel l-aktar metodu xieraq ta' ttestjar.
2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi assaġġ ta' skrinjar *in vivo* li fih hut maskili sesswalment matur u hut femminili li jkun qed ibid jinżammu flimkien u jiġu esposti għal sustanza kimika matul sehem limitat miċ-ċiklu tal-hajja tagħhom (21 jum). Fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni ta' 21 jum, skont l-ispeċi li tkun qed tintuża, jitkejjel punt ta' tmiem bijomarkatur wiehed jew tnejn fl-irġiel u n-nisa bħala indikatur ta' inibizzjoni estroġenika, tal-aromataži jew tal-attività androġenika tas-sustanza kimika tat-test; dawn il-punti ta' tmiem huma l-vitellogenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji. Il-vitellogenina titkejjel fil-karpjun buras, fil-medaka Gappuniża u fiż-żebra, filwaqt li l-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejjlu fil-karpjun buras u l-medaka Gappuniża biss.
3. Dan il-bijoassaġġ iservi bħala assaġġ ta' skrinjar *in vivo* għal ċerti modi ta' kif taħdem is-sistema endokrinali u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuntast tal-“Qafas Kuncettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi li Jfixxlu s-Sistema Endokrinali” (28).

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. Normalment il-vitellogenina tiġi prodotta mill-fwied ta' vertebrati ovipari nisa bħala rispons għall-estroġenu endoġenu li jkun qed jiċċirkola. Hija prekursor tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mad-demmu u tidhol fl-ovarji, fejn tiġi assorbita u modifikata mill-bajd li jkun qed jiżviluppa. Il-vitellogenina hija kwazi intraċċabbli fil-plażma ta' hut femminili u maskili immaturi għaliex m'għandhomx biżżejjed estroġenu jiċċirkola; madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi l-vitellogenina bħala rispons għal stimolazzjoni tal-estroġenu eżoġenu.

▼ M6

5. Il-kejl tal vitelloġenina jservi għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom diversi modi ta' azzjoni estrogenika. Id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estrogeniċi tista' ssir bil-kejl tal-induzzjoni tal-vitelloġenina fil-hut maskili, u għet dokumentata sew fil-letteratura xjentifika evalwata bejn il-pari (eż. (7)). L-induzzjoni tal-vitelloġenina ntweriet ukoll wara espożizzjoni għal androġeni aromatizzabbli (8, 9). Tnaqqis fil-livell ta' estrogeni li jiċċir-kola fin-nisa, pereżempju permezz tal-inibizzjoni tal-aromatażi li tikkonverti l-androġenu endoġenu f'estroġenu naturali 17β-estradiol, jikkawża tnaqqis fil-livell ta' vitelloġenina, li jintuża għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom karatteristiċi inibitorji tal-aromatażi (10, 11). Ir-rilevanza bijoloġika tar-rispons tal-vitelloġenina wara inibizzjoni estrogenika/tal-aromatażi hija stabbilita u għet dokumentata b'mod estensiv. Madankollu, huwa possibbli wkoll li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata mit-tossiċità generali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità.
6. Ġew żviluppati b'suċċess diversi metodi ta' kejl u dawn ġew standardizzati għall-użu ta' rutina. Dan huwa l-każ fil-metodi ta' Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiċu (ELISA) speċifiċi għall-ispeċi li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-vitelloġenina prodotta f'kampjuni żgħar tad-demem jew tal-fwied miġbura minn hut individwali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Għall-kejl tal-VTG jittiehed kampjun tad-demem tal-karpjun buras, id-demem taż-żebra jew l-omoġenat tar-ras/denb, u l-fwied tal-medaka. Fil-medaka, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla mid-demem u mill-fwied (19). L-Appendiċi 6 jipprovdi l-proċeduri rrakkomandati għall-ġbir tal-kampjuni għall-analiżi tal-vitelloġenina. Kits għall-kejl tal-vitelloġenina jistgħu jinkisbu faċilment; dawn il-kits għandhom ikunu bbażati fuq metodu ELISA vvalidat li jkun speċifiku għall-ispeċi.
7. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji f'hut maskili ta' ċerti speċijiet jidhru fuq barra, huma kwantifikabbli u jirrispondu għal-livelli ta' androġeni endoġeni li jiċċirkolaw; dan huwa l-każ għall-karpjun buras u l-medaka — iżda mhux għaž-żebra, li m'għandhiex karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli. In-nisa jżommu l-kapaċità li jiżviluppaw karatteristiċi sesswali sekondarji maskili, meta jiġu esposti għal sustanzi kimiċi androġeniċi fl-ilma. Hemm bosta studji disponibbli fil-letteratura xjentifika li jiddokumentaw dan it-tip ta' rispons fil-karpjun buras (20) u fil-medaka (21). Tnaqqis fil-karatteristiċi sesswali sekondarji fl-irġiel għandu jiġi interpretat b'kawtela minhabba saħħa statistika dgħajfa, u għandu jkun ibbażat fuq ġudizzju espert u l-piż tal-evidenza. Hemm limitazzjonijiet dwar l-użu taż-żebra f'dan assaġġ, minhabba n-nuqqas ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli li jirrispondu għal sustanzi kimiċi b'effetti androġeniċi.
8. Fil-karpjun buras, l-indikatur ewlieni ta' espożizzjoni androġenika eżoġena huwa l-ġhadd ta' tuberkuli tan-namra (*nuptial tubercles*) li jinsabu fuq imnieher il-huta femminili. Fil-medaka, l-ġhadd ta' proċessi papillari jikkositwixxi l-markatur ewlieni ta' espożizzjoni eżoġena għal sustanzi kimiċi androġeniċi f'hut femminili. L-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B jindikaw il-proċeduri rrakkomandati li għandhom jiġu segwiti għall-valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali fil-karpjun buras u fil-medaka, rispettivament.
9. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

10. Fl-assaġġ, il-hut maskili u dawk femminili li jkunu fi stat riproduttiv jiġu esposti f'reċipjenti tat-test flimkien. L-istat adult u riproduttiv tagħhom jippermetti sabiex issir differenzjazzjoni ċara bejn is-sessi, u b'hekk tkun tista' ssir analiżi relatata mas-sess ta' kull punt ta' tmiem, u jiżgura s-sensittività tagħhom lejn sustanzi kimiċi esoġeni. Fi tmiem it-test, is-sess jiġi

▼ **M6**

kkonfermat permezz ta' eżami makroskopiku tal-gonadi wara ftuħ ventrali tal-addome b'imqass. Fl-Appendiċi 2 tingħata harsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet rilevanti tal-bijoassagġ. Normalment l-assagġ jinbada b'kampjun ta' ħut minn popolazzjoni li tkun f'kundizzjoni riproduttiva; m'għandhomx jintużaw annimali li qed jixxjeh. Fis-sezzjoni dwar l-Għażla tal-ħut hija pprovduta gwida dwar l-età tal-ħut u dwar l-istatus riproduttiv. L-assagġ isir permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi li jintużaw għall-espożizzjoni kif ukoll kontroll tal-ilma, u kontroll tas-solvent jekk ikun hemm bżonn. Għal kull trattament jintużaw żewġ reċipjenti jew repliki (kull reċipjent ikun fih 5 irġiel u 5 nisa) fil-medaka u ż-żebra, filwaqt li fil-karpjun buras jintużaw erba' reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 2 irġiel u 4 nisa). Dan isir biex tiġi akkomodata l-imġiba territorjali tal-karpjun buras maskili filwaqt li jinżamm assagġ b'saħħtu biżżejjed. L-espożizzjoni ssir għal 21 jum u l-kampjunar tal-ħut isir fil-21 jum ta' espożizzjoni.

11. Mal-kampjunar fil-jum 21, l-annimali kollha jinqatlu bla tbatija. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u fil-medaka (ara l-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B); fiż-żebra u l-karpjun buras jingabru kampjuni tad-demem għad-determinazzjoni tal-vitellogenina, inkella jistgħu jingabru r-ras/denb għad-determinazzjoni tal-vitellogenina fiż-żebra (Appendiċi 6); fil-medaka l-fwied jingabar għall-analiżi tal-VTG (Appendiċi 6).

IL-KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI TAT-TEST

12. Biex ir-rizultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:
 - il-mortalità fil-kontrolli tal-ilma (jew tas-solvent) m'għandhiex taqbeż l-10 % fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni;
 - matul il-perjodu ta' espożizzjoni l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għandha tilhaq minimu ta' 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV);
 - it-temperatura tal-ilma fir-reċipjenti tat-test qatt m'għandha tvarja b'iktar minn $\pm 1,5$ °C matul il-perjodu ta' espożizzjoni u din għandha tinżamm fi hdan 2 °C tal-meded ta' temperaturi speċifikati għall-ispeċi tat-test (Appendiċi 2);
 - l-evidenza għandha tkun disponibbli biex jintwera li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-valuri medji mkejlin.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

13. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:
 - (a) ossigenometri u apparati li jkejlu l-pH;
 - (b) tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u l-alkalinità tal-ilma;
 - (c) apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;
 - (d) tankijiet magħmulin minn materjal kimiku inerti u ta' kapaċità adattata b'rabta mad-densità rrakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 2);
 - (e) sottostrat tal-bidien għall-karpjun buras u ż-żebra, l-Appendiċi 4 jagħti d-dettalji neċessarji;
 - (f) bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa $\pm 0,5$ mg).

▼ **M6****Ilma**

14. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' $\pm 0,5$ unitajiet tal-pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma tad-dilwizzjoni ma jinfluwenzax bla bżonn ir-riżultat tat-test (pereżempju billi jbidel is-sustanza kimika tat-test; kull ċertu żmien għandhom jittiehdu kampjuni biex jiġu analizzati). Fejn l-ilma tad-dilwizzjoni ikun magħruf li huwa relattivament kostanti fil-kwalità, il-kejl ta' metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, u Ni), ta' anjoni u katjoni ewlenin (eż. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , u SO_4^{2-}), ta' pesticidi (eż. pesticidi organofosforiċi totali u pesticidi organokloriniċi totali), ta' karbonju organiku u ta' solidi sospiżi totali għandu jsir, pereżempju, kull tliet xhur. Jekk ikun intwera li l-kwalità tal-ilma hija kostanti matul tal-anqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas spissi u l-intervalli jistgħu jittawlu (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma b'dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 3.

Is-soluzzjonijiet tat-test

15. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin jiġu preparati billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi ppreparata permezz ta' sempliċi thallit jew theżżiż tas-sustanza kimika tat-test f'ilma tad-dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. thawwid jew ultrasonikazzjoni). Biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija konċentrata adegwata jistgħu jintużaw kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità). L-użu ta' portatur ta' solvent mhuwiex rakkomandat. Madankollu, f'każ li jkun hemm bżonn ta' solvent, fl-istess hin għandu jsir solvent ta' kontroll ukoll, fl-istess konċentrazzjoni tas-solvent bħat-trattamenti kimiċi. Għal sustanzi kimiċi tat-test diffiċli, teknikament solvent jista' jkun l-aħjar soluzzjoni; għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossicità akwatika ta' sustanzi u tahlitiet diffiċli (22). L-għażla tas-solvent tiġi determinata mill-karatteristiċi kimiċi tas-sustanza kimika. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' 100 µl/l, li għandu jiġi osservat. Madankollu revizzjoni reċenti (23) enfasizzat fuq thassib addizzjonali meta jintużaw solventi għall-ittestjar tal-attività fis-sistema endokrinali. Għalhekk, huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjoni tas-solvent, jekk ikun mehtieg, tiġi minimizzata meta dan ikun teknikament fattibbli (skont il-proprietajiet fiżi-kokimiċi tas-sustanza kimika tat-test).
16. Għandha tintuża sistema ta' test bi fluss kontinwu. Sistema bħal din tiddistribwixxi u tiddilwixxi b'mod kontinwu soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) sabiex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u tal-ilma tad-dilwizzjoni għandhom jiġu ċċekkjati kull ċertu żmien, idealment kuljum, matul it-test u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik ta' grad baxx jew materjal iehor li jista' jkun fih sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi. Meta jkun qed jintgħażel il-materjal għas-sistema bi fluss kontinwu, għandha titqies il-possibilità li s-sustanza kimika tat-test tiġi adsorbita f'dan il-materjal.

Iż-żamma tal-hut

17. Il-hut tat-test għandu jintgħażel minn popolazzjoni tal-laboratorju, idealment minn stokk wiehed, li jkun idderra għal mill-inqas gimghatejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test. Importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-istokkjar (għad-definizzjonijiet, ara l-Appendiċi 1) jkunu xierqa għall-ispeċi tat-test użata (ara l-Appendiċi 2).
18. Wara perjodu ta' 48 siegħa li fih il-hut jithallew joqogħdu, jiġu rreġistrati l-mortalitajiet u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

▼ **M6**

- mortalitajiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott kollu jitwarrab;
 - mortalitajiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem oħra; jekk ikun hemm mortalità oghla minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, il-lott kollu jitwarrab;
 - mortalitajiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott jiġi aċċettat
19. Matul il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, fil-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni, jew matul il-perjodu ta' espożizzjoni l-hut m'għandux jingħata kura għal mard.

Preespożizzjoni u l-għażla tal-hut

20. Huwa rrakkomandat li jkun hemm perjodu ta' preespożizzjoni ta' ġimgħa, li matulu l-annimali jitqieghdu f'reċipjenti simili għal dawk tat-test innifsu. Matul il-perjodu ta' żamma u matul il-fażi ta' espożizzjoni l-hut għandhom jintemgħu *ad libitum*. Il-fażi ta' espożizzjoni tinbeda b'hut adulti sesswalment dimorfiku minn provvista tal-laboratorju ta' annimali maturi biżżejjed għar-riproduzzjoni (eż. b'karatteristiċi sesswali sekondarji li jidhru fir-rigward tal-karpjun buras u l-medaka), u li jkunu qed ibidu b'mod attiv. Għal gwida ġenerali biss (u dan ma għandux jitqies mingħajr l-osservazzjoni tal-istatus riproduttiv propju ta' lott partikolari ta' hut), il-karpjuni buras għandu jkollhom madwar $20 (\pm 2)$ ġimgħa, jekk wiehed jassumi li jkunu ġew ikkolturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul hajjithom. Il-medaka Gappuniża għandu jkollha madwar $16 (\pm 2)$ -il ġimgħa, jekk wiehed jassumi li jkunu ġew ikkolturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul hajjithom. Iz-zebra għandu jkollhom madwar $16 (\pm 2)$ -il ġimgħa, jekk wiehed jassumi li jkunu ġew ikkolturati f'temperatura ta' 26 ± 2 °C matul hajjithom.

ID-DISINN TAT-TEST

21. Jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, kontroll wiehed (tal-ilma) u, jekk ikun hemm bżonn, kontroll tas-solvent. Id-dejta tista' tiġi analizzata sabiex jiġu determinati differenzi statistikament sinifikanti bejn ir-risponsi għat-trattament u għall-kontroll. Dawn l-analizzijiet ser jindikaw jekk hemmx il-htieġa ta' ittestjar ulterjuri aktar fit-tul għal effetti avversi (jiġifieri, sopravivenza, żvilupp, tkabbir u riproduzzjoni) għas-sustanza kimika, aktar milli għall-użu fil-valutazzjoni tar-riskju (24).
22. Għaż-zebra u l-medaka, fil-jum 21 tal-esperiment, l-irġiel u n-nisa minn kull livell ta' trattament (5 irġiel u 5 nisa f'kull wiehed miż-żewġ repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitellogenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji, fejn applikabbli. Għall-karpjun buras, fil-jum 21 ta' espożizzjoni, l-irġiel u n-nisa (2 irġiel u 4 nisa f'kull wiehed mill-erba' repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitellogenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

L-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

23. Għall-finijiet ta' dan it-test, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tiġi stabbiliti mill-konċentrazzjoni massima tollerata (MTC) li tiġi ddeterminata minn *range finder* jew minn dejta oħra dwar it-tossicità, jew 10 mg/l, jew is-solubilità massima fl-ilma, skont liema tkun l-aktar baxxa. L-MTC hija definita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li twassal għal mortalità ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li teżisti dejta empirika dwar tossicità akuta jew dejta oħra dwar it-tossicità li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC tista' ma tkunx eżatta u normalment tehtieg ċertu ġudizzju professjonali.

▼ **M6**

24. Huma mehtieġa tliet konċentrazzjonijiet tat-test, spazjati b'fattur kostanti li ma jaqbiżx l-10, u kontroll ta' ilma tad-dilwizzjoni (u kontroll tas-solvent jekk ikun mehtieġ). Huwa rrakkomandat li l-fatturi ta' spazjar jkunu f'firxa ta' bejn 3.2 u 10.

PROCEDURA**L-ghażla u l-użin tal-hut tat-test**

25. Huwa importanti li fil-bidu tal-assaġġ tiġi minimizzata l-varjazzjoni fil-piż tal-hut. Il-meded ta' daqsijiet adattati għall-ispeċi differenti rrakkomandati għall-użu f'dan it-test huma mogħtija fl-Appendiċi 2. Għal-lott kollu ta' hut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali għall-hut maskili u femminili fil-bidu tat-test għandha, jekk possibbli, tinżamm bejn $\pm 20\%$ tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Huwa rrakkomandat li qabel it-test jintiżen sotto-kampjun tal-istokk tal-hut sabiex jiġi stmat il-piż medju.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni*Durata*

26. It-test idum għaddej 21 jum, wara perjodu ta' preespożizzjoni. Il-perjodu rrakkomandat ta' preespożizzjoni huwa ta' ġimgha.

Tmigh

27. Il-hut għandhom jintemghu *ad libitum* b'ikel adattat (Appendiċi 2) b'rata suffiċjenti biex tinżamm il-kundizzjoni tal-ġisem. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tkabbir mikrobiku u turbidità fl-ilma. Bħala gwida ġenerali, ir-razzjon ta' kuljum jista' jinqasam f'żewġ jew tliet porzjonijiet uguali għal tmigh multipli kuljum, separat b'mill-inqas tliet sigħat bejn kull tmigh. Huwa aċċettabbli li jingħata razzjon akbar uniku b'mod partikolari għat-tmim il-ġimgha. Il-hut m'għandux jingħata x'jiekol għal 12-il siegħa qabel il-kampjunar/nekroskopija.
28. L-ikel tal-hut għandu jiġi evalwat għall-preżenza ta' kontaminanti bħal pestiċidi organokloriniċi, idrokarboni aromatiċi policiklici (PAHs), bifenili poliklorinati (PCBs). Għandu jiġi evitat ikel b'livell għoli ta' fitoestrogeni li jista' jikkomprometti r-rispons tal-assaġġ għal agonisti magħrufa tal-estrogeni (eż. 17-beta estradiol).
29. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandu jitneħħa mir-reċipjent tat-test tal-inqas darbtejn fil-ġimgha, eż. billi l-qiegh ta' kull tank jitnaddaf sew permezz ta' sifun.

Dawl u temperatura

30. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu adattati għall-ispeċi tat-test (ara Appendiċi 2).

Il-frekwenza tad-determinazzjonijiet analitiċi u tal-kejl

31. Qabel jibda l-perjodu ta' espożizzjoni, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi kollha mehtieġa, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabbiltà kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli regolari, kif ġej: idealment, ir-rati tal-fluss tas-soluzzjoni ewlenija dilwenti u tossikanti għandhom jiġu vverifikati kuljum, iżda tal-inqas darbtejn fil-ġimgha, u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test innifsu jitkejlu fir-reċipjenti kollha fil-bidu tat-test u f'intervalli ta' ġimgha wara dan.
32. Huwa rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti bejn $\pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla.
33. Il-kampjuni jistgħu jehtieġu jiġu ffiltrati (eż., bl-użu ta' pori ta' 0,45 µm) jew jiġu centrifugati. Jekk ikun hemm bżonn, imbagħad iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rrakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tat-test ma jiġix adsorbit mill-filtru, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.

▼ **M6**

34. Matul it-test, l-ossigenu dissolt, it-temperatura, u l-pH għandhom jitkejlu fir-reċipjenti kollha tat-test tal-inqas darba fil-gimgha. L-ebusija u l-alkalinità totali għandhom jitkejlu fil-kontrolli u fir-reċipjent wiehed fl-oghla konċentrazzjoni tal-anqas darba fil-gimgha. Idealment, it-temperatura għandha tiġi ssorveljata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wiehed tat-test.

Osservazzjonijiet

35. Għadd ta' risponsi ġenerali (eż. sopravivenza) u r-risponsi bijoloġiċi ewlenin (eż. il-livelli tal-vitellogenina) jiġu vvalutati matul l-assaġġ jew fi tmiem l-assaġġ. Il-kejl u l-valutazzjoni ta' dawn il-punti ta' tmiem u l-utilità tagħhom huma deskritti hawn taht.

Sopravivenza

36. Matul il-perjodu tat-test, il-hut għandu jiġi ezaminat kuljum u kwalunkwe mortalità għandha tiġi rreġistrata u l-hut mejjet għandu jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-hut mejjet m'għandux jiġi sostitwit la fir-reċipjent tal-kontroll u lanqas fir-reċipjent tat-trattament. Is-sess tal-hut li jmut matul it-test għandu jiġi determinat permezz ta' evalwazzjoni makroskopika tal-gonadi.

Imġiba u dehra

37. Għandha tittiehed nota ta' kwalunkwe mġiba abnormali (relatata mal-kontrolli); din tista' tinkludi sinjali ta' tossiċità ġenerali inklużi iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, telf tal-bilanċ, u inattività jew tmigh mhux tas-soltu. Barra minn hekk għandha tittiehed nota ta' anormalitajiet esterni (bħal emorragija, skolorazzjoni). Dawn is-sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu kkunsidrati bir-reqqa waqt l-interpretazzjoni tad-dejta peress li jistgħu jindikaw konċentrazzjonijiet li fihom il-bijomarkaturi ta' attività endokrinali ma jkunux affidabbli. Dawn l-osservazzjonijiet tal-imġiba jistgħu anke jipprovdur informazzjoni kwalitattiva biex jinkiseb tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-hut. Per eżempju, fil-karpjuni buras, l'irgħiel normali jew l'nisja b'karatteristiċi maskili għet osservata aggressività territorjali matul espożizzjoni androgenika; fiż-żebra, l-imġiba karatteristika ta' tgħammir u riproduzzjoni wara jinxteghel id-dawl tiddgħajef jew tiġi mfixkla minn espożizzjoni estrogenika jew antiandrogenika.

38. Peress li xi aspetti tad-dehra (primarjament il-kulur) jistgħu jinbidlu malajr bit-tqandil, importanti li l-osservazzjonijiet kwalitattivi jsiru qabel ma l-annimali jitneħħew mis-sistema tat-test. L-esperjenza miksuba s'issa bil-karpjuni buras tissuggerixxi li għall-ewwel xi sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi esterni li għajjin: il-kulur tal-ġisem (ċar jew skur), mudelli ta' kolorazzjoni (il-preżenza ta' strixxi vertikali), u l-forma tal-ġisem (ir-ras u r-reġjun pettorali). Għalhekk, l-osservazzjonijiet dwar id-dehra fiżika tal-hut għandhom isiru matul it-test, u fi tmiem l-istudju

Il-qtil bla tbatija tal-hut

39. Fil-jum 21, jiġifieri fi tmiem l-espożizzjoni, il-hut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' Trikaina (Trikaina metan sulfonat, Metakaina, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l ibbaferjat bi 300 mg/l NaHCO₃ (bikarbonat tas-sodju, CAS 144-55-8) biex titnaqqas l-irritazzjoni fil-membrana mukuża; imbagħad jittiehed kampjun tad-demmi jew it-tessut għad-determinazzjoni tal-vitellogenina, kif spjegat fis-sezzjoni tal-Vitellogenina.

▼ M6

Osservazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji

40. Ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (l-ghadd ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras maskili, il-proċessi papillari fil-medaka maskili). B'mod partikulari, sustanzi kimiċi li jkollhom ċerti modi ta' azzjoni jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fl-annimali tas-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal trenbolon, metiltestosteron u diidrotestosteron, jistgħu jwasslu sabiex il-karpjuni buras femminili jiżviluppaw tuberkuli tan-namra prominenti jew sabiex il-medaka femminili tizviluppa proċessi papillari (11, 20, 21). Għe rrapportat ukoll li l-agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-ghadd tat-tuberkuli tan-namra u d-daqs tal-kuxxinett tal-kozz dorsali f'irġiel adulti (25, 26). Dawn l-osservazzjonijiet morfoloġiċi grossi jistgħu jipprovdu tagħrif kwalitattiv u kwantitattiv siewi biex jingħata tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-hut. L-ghadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjun buras u l-proċessi papillari fil-medaka jistgħu jiġu kkwantifikati b'mod dirett jew b'mod aktar Prattiku f'kampjuni ppreservati. Il-proċeduri rrakkomandati għall-evalwazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u l-medaka huma disponibbli mill-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B, rispettivament.

Vitellogenina (VTG)

41. Id-demm jingabar mill-arterja/vina kawdali permezz ta' tubulu kapillari mikroematokritiku eparinizzat, jew inkella permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa. Skont kemm hi kbira l-huta, il-volumi tad-demmi li jistgħu jingabru ġeneralment ivarjaw bejn 5 u 60 μ l għal kull huta individwali għall-karpjuni buras u minn 5-15 μ l għal kull huta individwali għaž-żebra. Il-plażma tiġi separata mid-demmi permezz ta' ċentrifugazzjoni, u tinħażen ma' inibituri tal-proteazi f'temperatura ta' -80°C , sakemm tiġi analizzata għall-vitellogenina. Inkella, fil-medaka jintuza l-fwied, u fiż-żebra l-omoġenat tar-ras/denb jista' jintuza bħala sors ta' tessut għad-determinazzjoni tal-vitellogenina (Appendiċi 6). Il-kejl tal-VTG għandu jkun imsejjes fuq metodu ELISA omologu vvalidat, bl-użu ta' standard omologu tal-VTG u antikorpi omologi. Huwa rrakkomandat li jintuza metodu li jkun kapaċi jiskopri livelli ta' VTG baxxi daqs ftit ng/ml fil-plażma (jew ng/mg fit-tessut), li huwa l-livell ta' sfond f'hut maskili li ma jkunx għe espost.
42. Il-kontroll tal-kwalità tal-analiżi tal-vitellogenina jintlaħaq permezz tal-użu ta' standards, bjanki u tal-anqas analiżijiet duplikati. Għal kull metodu ELISA, għandu jsir test għall-effett matrici (effett ta' dilwizzjoni ta' kampjun) biex jiġi determinat il-fattur minimu tad-dilwizzjoni tal-kampjun. Kull platt ELISA li jintuza għall-assaġġi tal-VTG għandu jinkludi l-kampjuni tal-kontroll tal-kwalità li ġejjin: tal-anqas 6 standards ta' kalibraġġ li jkopru l-firxa ta' konċentrazzjonijiet mistennija tal-vitellogenina, u tal-anqas bjank tal-assaġġ mhux speċifiku wiehed (analiżi duplikata). L-assorbiment ta' dawn il-bjanki għandu jkun ta' anqas minn 5 % tal-assorbiment standard massimu ta' kalibrizzjoni. Minn kull kampjun ta' dilwizzjoni jiġu analizzati tal-anqas żewġ alikwoti (*well-duplicates*). *Well-duplicates* li jvarjaw b'aktar minn 20 % għandhom jerġghu jiġu analizzati.
43. Il-koeffiċjent tal-korrelazzjoni (R^2) għall-kurvi ta' kalibrizzjoni għandu jkun ta' aktar minn 0,99. Madankollu, korrelazzjoni għolja mhijiex biżżejjed biex tiggarantixxi tbassir adegwat tal-konċentrazzjoni fil-medak kollha. Minbarra li jkun hemm korrelazzjoni għolja biżżejjed għall-kurva ta' kalibrizzjoni, il-konċentrazzjoni ta' kull standard, kif ikkalkolata mill-kurva ta' kalibrizzjoni, dejjem għandha taqa' bejn 70 u 120 % tal-konċentrazzjoni nominali tiegħu.

▼ **M6**

Jekk il-konċentrazzjonijiet nominali jxaqilbu lil hinn mil-linja ta' rigressjoni tal-kalibrazzjoni (eż. f'konċentrazzjonijiet inqas), jista' jkun hemm bżonn li l-kurva ta' kalibrazzjoni tinqasam f'med baxxi u għoljin jew li jintuża mudell nonlineari li jaqbel b'mod adegwat mad-dejta dwar l-assorbiment. Jekk il-kurva tinqasam, iż-żewġ segmenti tal-linja għandu jkollhom $R^2 > 0,99$.

44. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku, u l-limitu ta' kwantitazzjoni (LOQ) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku mmultiplikata bl-inqas fattur ta' dilwizzjoni.
45. F'kull jum li fih isiru l-assaġġi tal-vitellogenina għandu jiġi analizzat kampjun ta' fortifikazzjoni permezz ta' standard ta' referenza interassaġġi (Appendiċi 7). Il-proporzjon tal-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla jiġi rrapportat flimkien mar-risultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

DEJTA U RAPPORTAR**Valutazzjoni tar-Risponsi tal-Bijomarkatur permezz ta' Analizi tal-Varjanza (ANOVA)**

46. Biex tiġi identifikata l-attività endokrinali potenzjali ta' sustanza kimika, ir-risponsi jitqabblu bejn il-gruppi ta' trattament u ta' kontroll permezz ta' analizi tal-varjanza (ANOVA). Meta jintuża kontroll tas-solvent, għandu jsir test statistiku xieraq bejn il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u l-kontroll tas-solvent għal kull punt ta' tmiem. Gwida dwar kif titratta d-dejta dwar il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u dik dwar is-solvent fl-analizi statistika sussegwenti tista' tinstab fl-OECD, 2006c (27). Id-dejta kollha dwar ir-rispons bijoloġiku għandha tiġi analizzata u rrapportata separatament skont is-sess. Jekk ma jintlaħqux is-suppożizzjonijiet mehtieġa għall-metodi parametriċi — distribuzzjoni mhux normali (eż. it-test ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (it-test ta' Bartlett jew it-test ta' Levene), għandha tiġi kkunsidrata l-possibilità li d-dejta tiġi konvertita f'varjanzi omoġenizzati qabel ma ssir l-ANOVA, jew qabel ma ssir ANOVA ppeżata. It-test ta' Dunnett (parametrik) fuq tqabbiliet multipli bejn pari jew it-test ta' Mann-Whitney b'aggustament Bonferroni (mhux parametrik) jista' jintuża għal rispons mhux monotonu għad-doża. Jekk ir-rispons għad-doża ikun kważi monotonu jistgħu jintużaw testijiet statistiċi ohra (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test ta' Williams). Fl-Appendiċi 8 giet ipprovduta flowchart statistika biex tghin fid-deċiżjoni dwar l-aktar test statistiku xieraq li għandu jintuża. Tagħrif addizzjonali jista' jinkiseb ukoll mid-Dokument tal-OECD dwar Approċċi Attwali lejn l-Analizi Statistika ta' Dejta dwar l-Ekotożiċità (27).

Rapportar tar-risultati tat-test

47. Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Il-faċilità ta' ttestjar:

- Persunal responsabbli u r-responsabbiltajiet ta' studju tagħhom
- Kull laboratorju għandu jkun wera profiċjenza fl-użu ta' firxa ta' sustanzi kimiċi rappreżentattivi

Is-sustanza kimika tat-test:

- Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test
- In-natura fizika u l-proprietajiet fizikokimiċi rilevanti

▼ M6

— Il-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tat-test

— Informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-bijodegradabilità

Solvent:

— Karatterizzazzjoni tas-solvent (in-natura, il-konċentrazzjoni użata)

— Ġustifikazzjoni tal-ghażla tas-solvent (jekk ma jkunx ilma)

Annimali tat-test:

— L-ispeċi u r-razza

— Il-fornitur u l-faċilità speċifika tal-fornitur

— L-età tal-hut fil-bidu tat-test u l-istatus ta' riproduzzjoni

— Dettalji tal-proċedura ta' akklimatizzazzjoni tal-annimali

— Il-piż tal-ġisem tal-hut fil-bidu tal-espożizzjoni (minn sottokampjun tal-istokk tal-hut)

Kundizzjonijiet tat-Test:

— Il-proċedura tat-test użata (it-tip tat-test, ir-rata tat-tagħbija, id-densità tal-istokkjar, eċċ.);

— Il-metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u r-rata tal-fluss;

— Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test imkejla kull ġimgha u l-metodu analitiku użat, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard fir-reċipjenti tat-test u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni vera;

— Il-karatteristiċi tal-ilma tad-dilwizzjoni (inkluż il-pH, l-ebusija, l-alkalinità, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlul, il-livelli ta' klorin residwu, il-karbonju organiku totali, is-solidi sospizi u kwalunkwe kejl ieħor li jkun sar)

— Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlul;

— Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmiġh (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont li ngħata u l-frekwenza u analizzjiet għal kontaminanti rilevanti jekk disponibbli (eż. PCBs, PAHs u pestiċidi organoklorurati).

Riżultati

— Evidenza li l-kontrolli jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;

— Dejta dwar il-mortalitajiet li jsejtnu fi kwalunkwe konċentrazzjoni tat-test u fil-kontroll;

— Tekniki analitiċi statistiċi użati, it-trattament tad-dejta u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati;

— Dejta dwar osservazzjonijiet bijoloġiċi ta' morfoloġija grossa, inklużi l-karatteristiċi sesswali sekondarji u l-vitellogenina;

▼ M6

- Riżultati tal-analizi tad-dejta, idealment f'forma tabulari u grafika;
- Inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-hut u kwalunkwe effett vizibbli kkawżat mis-sustanza kimika tat-test

GWIDA GHALL-INTERPRETAZZJONI U L-AĊĊETTAZZJONI TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

48. Din is-sezzjoni fiha ftit kunsiderazzjonijiet li għandhom jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test għad-diversi punti ta' tmiem imkejla. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'kawtela fejn is-sustanza kimika tat-test tidher li tkun qed tikkawża tossiċità evidenti jew li qed ikollha impatt fuq il-kundizzjoni ġenerali tal-annimal tat-test.
49. Meta tkun qed tiġi stabbilita l-medda tal-koncentrazzjonijiet tat-test, għandha tinghata attenzjoni biex ma tinqabizx il-koncentrazzjoni massima tollerata biex tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Importanti li tal-anqas ikun hemm trattament wiehed li fih ma jkunx hemm sinjali ta' effetti tossiċi. Sinjali ta' mard u sinjali ta' effetti tossiċi għandhom jiġu vvalutati u rrapportati f'ċertu dettall. Pereżempju, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata wkoll mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità. Madankollu, l-interpretazzjoni tal-effetti tista' tiġi sostnuta minn livelli oħra ta' kura li ma jiffixklux mit-tossiċità sistemika.
50. Hemm xi aspetti li wiehed irid iqis għall-aċċettazzjoni tar-riżultati tat-test. Bħala gwida, il-livelli tal-VTG f' gruppi ta' kontroll tal-irġiel u tan-nisa għandhom ikunu distinti u separati b'madwar tliet ordnijiet ta' kobor fil-karjun buras u fiż-żebra, u b'madwar ordni uniku ta' kobor għall-medaka. Eżempji tal-medda ta' valuri li wiehed jista' jiltaqa' magħhom fil-gruppi ta' kontroll u ta' kura huma disponibbli fir-rapporti ta' validazzjoni (1, 2, 3, 4). Valuri għolja tal-VTG fl-irġiel ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-rispons tal-assaġġ u l-kapaċità tiegħu li jiskopri agonisti dgħajfa tal-estrogeni. Valuri baxxi tal-VTG fin-nisa ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-risponsività tal-assaġġ u l-hila tiegħu li jiskopri inibituri tal-aromatazi u antagonisti tal-estrogeni. Biex tinbena dik il-gwida ntuzaw l-istudji ta' validazzjoni.
51. Jekk laboratorju ma jkunx għamel l-assaġġ qabel jew jekk ikunu saru bidliet sostanzjali (eż. bidla fir-razza tal-hut jew tal-fornitur) huwa rrakkomandat li jsir studju tal-profiċjenza teknika. Huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi kimiċi li jkopru firxa ta' modi ta' azzjoni jew impatti fuq għadd tal-punti ta' tmiem tat-test. Fil-prattika, kull laboratorju huwa mhegġeġ jibni dejta storika ta' kontroll propja għall-irġiel u għan-nisa u biex jagħmel kimika ta' kontroll pozittiv għall-attività estrogenika (eż. 17 β -estradiol f'doża ta' 100 ng/l, jew agonist dgħajf magħruf) li twassal għal zieda fil-VTG fil-hut maskili, kimika ta' kontroll pozittiv għall-inibizzjoni tal-aromatazi (eż. fadrozole jew prochloraz f'doża ta' 300 μ g/l) li twassal għal tnaqqis fil-VTG fil-hut nisa, u kimika ta' kontroll pozittiv għall-attività androgenika (eż. 17 β -trenbolon f'doża ta' 5 μ g/l) li twassal għall-induzzjoni ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karjun buras u l-medaka femminili. Din id-dejta kollha tista' titqabbal ma' dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni (1, 2, 3) biex tiġi żgurata l-profiċjenza tal-laboratorju.
52. B'mod ġenerali, il-kejl tal-vitellogenina għandu jitqies pozittiv jekk ikun hemm zieda statistikament sinifikanti fil-VTG fl-irġiel ($p < 0,05$), jew tnaqqis statistikament sinifikanti fin-nisa ($p < 0,05$) tal-anqas fl-ogħla doża ttestjata meta mqabbla mal-grupp ta' kontroll, u fin-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità ġenerali. Riżultat pozittiv jikseb sostenn ikbar meta jintwera li hemm relazzjoni bijoloġikament plawżibbli bejn id-doża u l-kurva tar-rispons. Kif intqal qabel, it-tnaqqis fil-vitellogenina jaf ma jkollux oriġini kompletament endokrinali; madankollu, ġeneralment riżultat pozittiv għandu jiġi interpretat bħala evidenza ta' attività endokrinali *in vivo*, u normalment għandu jagħti bidu għal azzjonijiet għal kjarifika ulterjuri.

▼ **M6**

LETTERATURA

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Kif b'suċċess ta' inibituri (anti-)androġeniċi u aromatase f'karpjuni buras adulti qabel ir-riproduzzjoni (*Pimephales promelas*) permezz ta' punti ta' tmiem li jitkejlu faċilment ta' żvilupp sesswali. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼ **M6**

- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Applikazzjoni ta' ELISA għall-kwantifikazzjoni ta' konċentrazzjonijiet ta' vitellogenin f'karpjuni buras (*Pimephales promelas*) esposti għal kimiċi li jfixxlu l-endokrina. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksøyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69-92.
- (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
- (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.

▼ M6

- (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18
- (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼ M6*Appendiċi 1***Abbrevjazzjonijiet u definizzjonijiet**

Sustanza Kimika: Sustanza jew tahlita

CV: Koeffiċjent ta' varjazzjoni.

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiċu.

Rata ta' tagħbija: Piż bil-likwidu tal-hut f'kull volum ta' ilma.

Densità tal-istokkjar: L-ghadd ta' hut f'kull volum ta' ilma.

VTG (Vitelloġenina): Prekursur tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment isehh f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

Assi HPG: Assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali.

MTC: Konċentrazzjoni Massima Tollerata, li tirrappreżenta madwar 10 % tal-LC₅₀.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ M6

Appendiċi 2

Kundizzjonijiet sperimentali għall-assaġġ tal-iskrinjar tas-sistema endokrinali tal-hut

1. Speċijiet Rakkomandati	Karpjun buras (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Żebra (<i>Danio rerio</i>)
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')
5. Intensità tad-dawl	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu (it-tranzizzjonijiet bejn tluġ ix-xemx / nżul ix-xemx huma fakultattivi, mada-nakollu ma jittqisux neċessarji)	16-il siegħa ta' dawl, 8 siegħa ta' dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 siegħa dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 siegħa ta' dlam
7. Rata ta' tagħbija	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l
8. Daqs tal-kompartiment tat-test	10 l (minimu)	2 l (minimu)	5 l (minimu)
9. Volum tas-soluzzjoni tat-test	8 l (minimu)	1,5 l (minimu)	4 l (minimu)
10. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Minimu ta' 6 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum
11. Età tal-organizmi tat-test	Ara l-paragrafu 20	Ara l-paragrafu 20	Ara l-paragrafu 20
12. Piż imxarrab approssimattiv tal-hut adulti (g)	Nisa: 1,5 ± 20 % Irgiel: 2,5 ± 20 %	Nisa: 0,35 ± 20 % Irgiel: 0,35 ± 20 %	Nisa: 0,65 ± 20 % Irgiel: 0,4 ± 20 %
13. Nru ta' hut f'kull reċipjent tat-test	6 (2 irġiel u 4 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)
14. Nru ta' trattamenti	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)
15. Nru ta' reċipjenti għal kull trattament	Minimu ta' 4	Minimu ta' 2	Minimu ta' 2
16. Nru ta' hut għal kull konċentrazzjoni tat-test	16-il mara adulta u 8 irġiel (4 nisa u 2 irġiel f'kull reċipjent replika)	10 nisa adulti u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikant)	10 nisa adulti u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikant)
17. Reġim ta' tmigh	Gambli adulti jew nauplii tal-ilma mielah hajjin jew iffriżati darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew tahlita ta' dawn t'hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielah darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew tahlita ta' dawn t'hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielah darbtejn jew tliet darbiet kuljum (ad libitum), ikel disponibbli fis-suq jew tahlita ta' dawn ta' hawn fuq

▼ **M6**

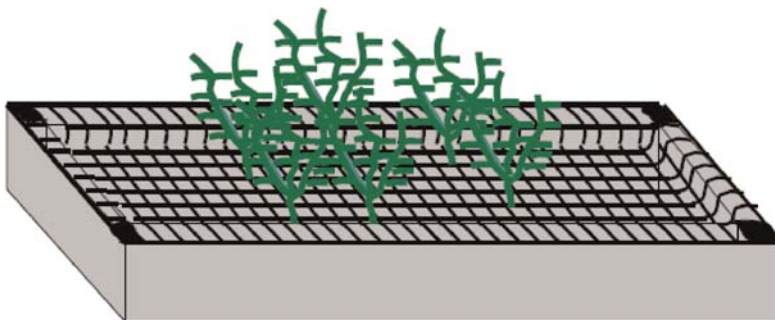
18. Ossigenazzjoni	Xejn hlief jekk il-koncentrazzjoni tad-DO taqa' taht is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn hlief jekk il-koncentrazzjoni tad-DO taqa' taht is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn hlief jekk il-koncentrazzjoni tad-DO taqa' taht is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja
19. Ilma tad-dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorat nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorat nadif
20. Perjodu ta' preespożizzjoni	7 ijiem rakkomandati	7 ijiem rakkomandati	7 ijiem rakkomandati
21. Durata tal-espożizzjoni kimika	21 jum	21 jum	21 jum
22. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	sopravivenza imġiba karatteristiċi sesswali sekondarji VTG	sopravivenza imġiba karatteristiċi sesswali sekondarji VTG	sopravivenza imġiba VTG
23. Aċċettabilità tat-test	Ossigenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 25 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-hut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi hdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossigenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 24 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-hut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi hdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossigenu dissolt > 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 26 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-hut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi hdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.

▼ **M6***Appendiċi 3***Uhud mill-karatteristiċi kimiċi ta' ilma tad-dilwizzjini aċċettabbli**

Komponent	Konċentrazzjonijiet
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Kloru residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Klorin organiku totali	< 25 ng/l

▼ **M6***Appendici 4A***Sottostrat għall-bidien għaž-żebra**

Trej għall-bidien: dixx kollu tal-ħġieġ, per eżempju $22 \times 15 \times 5,5$ cm ($l \times w \times d$), kopert b'kannizzata tal-azzar inossidabbli li tista' titneħħa (xibka wiesgħa 2 mm). Il-kannizzata għandha tghatti l-bokka tad-dixx f'livell taht ix-xifer.



Is-sottostrat tal-bidien għandu jitpoġġa fuq il-kannizzata. Għandu jipprovdi struttura biex il-hut ikunu jistgħu jidhlu fiha. Pereżempju, pjanti artifiċjali tal-akkwarji magħmulin minn materjal aħdar tal-plastik huma tajbin (NB: għandu jitqies l-adsorbiment possibbli tal-kimika tat-test fil-materjal tal-plastik). Il-materjal tal-plastik għandu jitbattal f'volum suffiċjenti ta' ilma shun għal tul ta' żmien suffiċjenti biex jiġi żgurat li ma tintreha ebda sustanza kimika fl-ilma tat-test. Meta jkun qed jintuza materjal tal-ħġieġ għandu jiġi żgurat li l-hut la jindarab u lanqas ma jkun iffullat matul l-azzjonijiet vigorużi tiegħu.

Id-distanza bejn it-trej u l-panewwi tal-ħġieġ għandha tkun ta' mill-inqas 3 cm biex jiġi żgurat li l-bidien ma jsirx barra mit-trej. Il-bajd li jitbied fuq it-trej jaqa' minn ġol-kannizzata u jista' jiġi kampjunat tliet kwarti sa siegħa wara l-bidu tal-illuminazzjoni. Il-bajd trasparenti ma jehilx u jista' jingħadd faċilment permezz tal-użu ta' dawl transversali. Meta jkunu qed jintużaw hames nisa f'kull reċipjent, sa 20 bajda f'għurnata jistgħu jitqiesu bħala kwantità baxxa, sa 100 bħala medja u aktar minn 100 bħala kwantità għolja. It-trej tal-bidien għandu jitneħħa, il-bajd għandu jingabar u t-trej tal-bidien għandu jerġa' jiddaħhal fir-reċipjent tat-test, jew l-aktar tard possibbli filgħaxija jew kmieni hafna filgħodu. It-trej tal-bidien m'għandux jithalla aktar minn siegħa biex jerġa' jiddaħhal peress li nkella s-sinjal tas-sottostrat tal-bidien jista' jinduċi tghammir individwali u bidien fi żmien mhux tas-soltu. Jekk sitwazzjoni tkun tehtieg li t-trej tal-bidien jiddaħhal aktar tard, dan għandu jsir mill-inqas 9 sigħat wara l-bidu tal-illuminazzjoni. F'dan il-hin tard fil-għurnata, il-bidien ma jibqax jiġi indott iktar.

▼ **M6***Appendici 4B***Sottostrat tal-bidien għall-karpjun buras**

F'kull kompartment tat-test jitqiegħdu żewġ jew tliet madumiet jew trejs riproduttivi kkombinati tal-plastik/ċeramika/ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli (eż., kanal semicirkulari griz twil 80 mm mqiegħed fuq trej bix-xoffa twil 130 mm) (ara l-istampa). Intwera li madum taċ-ċeramika jew tal-PVC akklimatizzati sew joqgħod bħala sottostrat tal-bidien (Thorpe *et al*, 2007).

Huwa rrakkomandat li l-madum jinbarax biex tittejjeb l-adeżjoni. It-trej għandu jiġi skrinjat ukoll biex il-hut jitwaqqaf milli jaċċessa l-bajd li jkun waqa' sakemm ma tkunx intweriet effiċjenza tas-sottostrat tal-bidien użat fl-adeżjoni tal-bajd.



Il-bażi hija ddisinjata biex iżzomm kwalunkwe bajd li ma jehilx mal-wiċċ tal-madum u għalhekk jaqa' f'qiegħ it-tank (jew dak il-bajd li jitbied direttament fuq il-bażi ċatta tal-plastik). Qabel jintużaw is-sottostrati tal-bidien għandhom jitbattlu lkoll għal mhux anqas minn 12-il siegħa, f'ilma tad-dilwizzjoni.

REFERENZI

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼ M6

Appendiċi 5A

Valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras għad-detezzjoni ta' ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali**Harsa ġenerali**

Karatteristiċi potenzjalment importanti fid-dehra fiżika fil-karpjuni buras adulti fl-ittestjar għal sustanzi li jfixxlu s-sistema endokrinali jinkludu l-kulur tal-ġisem (jiġifieri ċar/skur), il-mudelli ta' kolorazzjoni (jiġifieri l-preżenza jew in-nuqqas ta' faxex vertikali), il-forma tal-ġisem (jiġifieri l-forma tar-ras u tar-reġjun pettorali, id-distensjoni tal-addome), u l-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (jiġifieri l-ghadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra, id-daqs tal-kuxxinett dorsali u tal-ovipożitur).

It-tuberkuli tan-namra jinsabu fuq ir-ras (il-kuxxinett dorsali) tal-karpjuni buras irġiel riproduttivament-attivi, u ġeneralment ikunu rrangati f'mudell simmetriku bilaterament (Jensen et al. 2001). In-nisa tal-kontroll u l-irġiel u n-nisa żgħar ma juru l-ebda żvilupp ta' tuberkuli (Jensen et al. 2001). Jista' jkun hemm sa tmien tuberkuli individwali madwar l-ghajnejn u bejn l-immifsejn tal-irġiel. L-akbar għadd ta' tuberkuli u l-akbar tuberkuli jinsabu f'zewġ linji paralleli eżatt taht l-immieher u fuq il-halq. F'hafna hut hemm gruppi ta' tuberkuli taht ix-xedaq t'isfel; daww l-eqreb tal-halq ġeneralment jinsabu bħala par uniku, filwaqt li l-iktar sett ventrali jista' jkun magħmul minn massimu ta' erba' tuberkuli. L-ghadd attwali ta' tuberkuli rament ikun ta' aktar minn 30 (medda, 18-28; Jensen et al. 2001). It-tuberkuli predominanti (f'termini ta' għadd) huma preżenti bħala struttura waħda, relattivament tonda, b'għoli kważi ekwivalenti għar-raġġ. Hafna mill-irġiel attivi fir-riproduzzjoni għandhom ukoll, tal-anqas ftit, tuberkuli mkabbin u evidenti li m'humiex distingwibbli bħala strutturi individwali.

Xi tipi ta' sustanzi kimiċi li jfixxlu s-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' ċerti karatteristiċi sesswali sekondarji fis-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal 17β-metiltestosteron jew 17β-trenbolon, jistgħu jikkawżaw l-iżvilupp ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras nisa (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), filwaqt li agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-ghadd jew id-daqs tat-tuberkuli tan-namra fl-irġiel (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Hawn taht hawn deskrizzjoni tal-karatterizzazzjoni tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras fuq il-bażi ta' proċeduri użati fil-laboratorju tal-Environmental Protection Agency f'Duluth, MN, l-Istati Uniti. Prodotti u/jew tagħmir speċifiċi jistgħu jiġu sostitwiti ma' materjali paragonabbli disponibbli.

L-osservazzjoni ssir l-aħjar bl-użu ta' lenti illuminata jew mikroskopju 3X illuminat għad-dissezzjonijiet. Hares lejn il-huta mil-lat dorsali u anterjuri 'l quddiem (ir-ras lejn min ikun qed josserva).

a) Poġġi l-huta f'dixx Petri żgħir (eż., b'dijametru ta' 100 mm), anterjuri 'l quddiem, u ventrali 'l isfel. Iffoka l-viewfinder biex tippermetti l-identifikazzjoni tat-tuberkuli. Bil-galbu u bil-mod dawwar il-huta minn naha għall-oħra biex tidentifika ż-zoni fejn ikun hemm it-tuberkuli. Ghodd u kklassifika t-tuberkuli.

b) Irrepeti l-osservazzjoni fuq il-lat ventrali tar-ras billi tpoġġi l-lat anterjuri dorsali tal-huta 'l quddiem fid-dixx Petri.

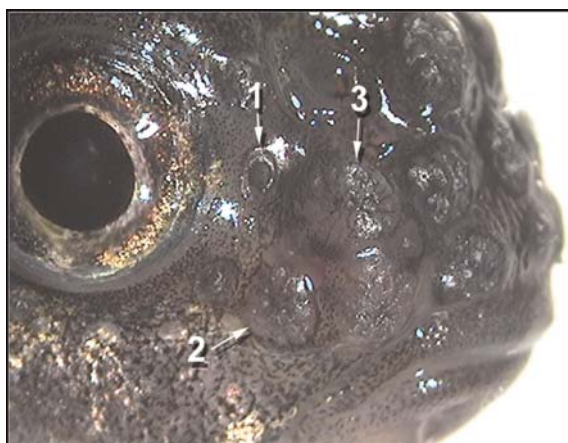
c) L-osservazzjonijiet għandhom jitlestew fi żmien 2 minuti għal kull huta.

▼ **M6****L-Ghadd u l-Klassifikazzjoni tat-Tuberkuli**

Ġew identifikati sitt żoni speċifiċi għall-valutazzjoni tal-preżenza u tal-iżvilupp tat-tuberkuli f'karpjuni buras adulti. Gie żviluppat mudell biex jiġi mmappjat il-post u l-kwantità tat-tuberkuli preżenti (ara tmiem dan l-Appendiċi). L-għadd ta' tuberkuli jiġi rreġistrat u d-daqs tagħhom jista' jiġi kklassifikat b'mod kwantitattiv bħala: 0- xejn, 1-preżenti, 2-imkabbrin u 3-evidenti għal kull organismu (Fig. 1).

Klassifikazzjoni ta' 0- ebda tuberkulu preżenti. Klassifikazzjoni ta' 1-preżenti, hija identifikata bħala kwalunkwe tuberkulu li jkollu punt uniku li l-gholi tiegħu ikun kwazi ekwivalenti għar-raġġ tiegħu (dijametru). Klassifikazzjoni ta' 2- mkabbrin, hija identifikata bħala tessut li fid-dehra jixbah asterisk, li ġeneralment ikollu bażi radjali kbira bi xquq jew kanali herġin miċ-ċentru. Hafna drabi l-gholi tat-tuberkuli ikun aktar ippizzjat iżda xi drabi jista' jkun naqra fit-tond. Klassifikazzjoni ta' 3- evidenti, ġeneralment ikun pjuttost kbir u ttundjat bi struttura inqas definita. Xi drabi dawn it-tuberkuli ikunu qrib xulxin u jiffurmaw massa waħda tul żona individwali jew tahlita ta' żoni (B, C u D, deskritti hawn taht). Il-kolorazzjoni u d-disinn huma simili għall-klassifikazzjoni ta' 2 iżda xi drabi ikunu pjuttost indiskriminati. Ġeneralment l-użu ta' din is-sistema ta' klassifikazzjoni jwassal għal punteġġi globali ta' tuberkuli ta' < 50 fraġel normali tal-kontroll b'għadd ta' 18 sa 20 tuberkulu (Jensen et al. 2001).

Figura 1



F'ċertu ħut l-għadd propju ta' tuberkuli jista' jkun akbar mill-kaxxi tal-mudelli (Appendiċi A) għal żona partikolari ta' klassifikazzjoni. F'dan il-każ, in-numri addizzjonali ta' klassifikazzjoni jistgħu jiġu mmarkati ġewwa, fuq il-lemin jew fuq ix-xellug tal-kaxxa. Għalhekk, il-mudell m'għandux għalfejn ikun simmetriku. Teknika addizzjonali għall-immappjar tat-tuberkuli f'pari jew meħmużin vertikament tul il-pjan orizzontali tal-halq tista' ssir billi f'kaxxa waħda jitnizzlu żewġ punti ta' klassifikazzjoni tat-tuberkuli.

Reġjuni ta' mmappjar:

A — Tuberkuli li jinsabu madwar l-ghajnejn. Jiġu mmappjati mil-lat dorsali għal dak ventrali madwar ir-rimm anterjuri tal-ghajn. Komunement dawn ikunu f'multipli f'irġiel maturi ta' kontroll, ma jkunux preżenti f'nisa ta' kontroll, ikunu ġeneralment f'par (wieħed hdejn kull ghajn) jew wahedhom f'nisa esposti għall-androġeni.

B — Tuberkuli li jinsabu bejn l-imnieher, (pori sensorjali fil-kanal). Normalment dawn ikunu f'pari f'irġiel tal-kontroll f'livelli aktar elevati (2- imkabbrin jew 3-evidenti) ta' żvilupp. Mhux preżenti f'nisa tal-kontroll b'xi okkorrenza u żvilupp f'nisa esposti għall-androġeni.

C — Tuberkuli li jinsabu eżatt wara l-imnieher, paralleli mal-halq. Ġeneralment dawn ikunu mkabbrin jew evidenti f'irġiel maturi tal-kontroll. Preżenti jew imkabbrin f'irġiel anqas żviluppati jew f'nisa ttrattati bl-androġeni.

▼ **M6**

D — Tuberkuli li jinsabu paralleli tul il-linja tal-halq. Generalment ikklassifikatati bħala żviluppati firgħiel tal-kontroll. Assenti f'nisa tal-kontroll iżda preżenti f'nisa esposti għall-androgeni.

E — Tuberkuli li jinsabu fuq ix-xedaq t'isfel, qrib il-halq, normalment ikunu żgħar u generalment ikunu f'pari. Ivarjaw firgħiel tal-kontroll jew ittrattati, u f'nisa ttrattati.

F — Tuberkuli li jinsabu fil-lat ventrali għal E. Normalment ikunu żgħar u f'pari. Preżenti firgħiel tal-kontroll u f'nisa esposti għall-androgeni.

REFERENZI

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Mudell għat-Tuberkuli

Klassifikazzjoni Numerika

ID _____

1-preżenti

Data _____

2-mkabbar

Total _____

3-pronunzjat

	A	X1	X1	X1	X1

	B	X1	X1	X1	X1

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

▼ **M6***Appendiċi 5B***Valutazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka għad-detezzjoni ta' ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali**

Hawn taht hawn deskrizzjoni tal-kejl tal-proċessi papillari (*), li huma l-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka (*Oryzias latipes*).

(*) Normalment il-proċessi papillari jidhru biss f'irġiel adulti u jinsabu fuq ix-xewk tal-pinen mit-tieni sas-seba' jew it-tmien wahda jekk wiehed jghodd min-naħa posterjuri tal-pinna anali (Fig.1 u 2). Madankollu, il-proċessi rarament jidhru fl-ewwel xewka tal-pinna mil-lat posterjuri tal-pinna anali. Dan l-SOP ikopri l-kejl ta' proċessi fuq l-ewwel xewka tal-pinna (l-ghadd ta' xewk tal-pinen jirreferi għall-ordni min-naħa posterjuri tal-pinna anali f'dan l-SOP).

- (1) Wara l-qtugħ tal-fwied (Appendiċi 6), il-karkassa titqiegħed f'tubu koniku li jkun fih madwar 10 ml ta' 10 % formalina newtrali bbaferjata ('il fuq: ir-ras, 'l isfel: id-denb). Jekk il-gonada titqiegħed f'soluzzjoni ohra li mhix 10 % formalina newtrali bbaferjata, aghmel qatgħa trasversali tul il-karkassa bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus permezz ta' xafra, u ara li ma tagħmilx ħsara lill-gonopori u l-gonada stess (Fig.3). Poġġi n-naħa kranjali tal-ġisem tal-huta fis-soluzzjoni fissattiva biex tippreserva l-gonada, u n-naħa tad-denb tal-ġisem tal-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata kif deskritta hawn fuq.
- (2) Wara li tpoġġi l-ġisem tal-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata, aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali b'pinzetta u itwih għal madwar 30 sekonda biex iżomm il-pinna anali miftuha. Meta tkun qed taqbad il-pinna anali b'pinzetta, aqbad ftit xewk tal-pinen fir-reġjun anterjuri bil-galbu biex ma tobroxx il-proċessi papillari.
- (3) Wara li żżomm il-pinna anali miftuha għal madwar 30 sekonda, aħžen ġisem il-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata f'temperatura ambjentali sakemm jitkejl l-proċessi papillari (il-kejl għandu jsir wara ffissar għal mhux anqas minn 24 siegħa).

Kejl

- (1) Wara l-iffissar tal-ġisem tal-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata għal mill-inqas 24 siegħa, iġbor il-karkassa tal-huta mit-tubu koniku u imsah il-formalina fuq il-karta tal-filtru (jew b'xugaman tal-karta).
- (2) Poġġi l-huta bl-addome 'l fuq. Imbagħad aqta' l-pinna anali b'imqass żgħir tad-dissezzjoni bil-galbu (idealment għandek taqta' l-pinna anali b'ammont żgħir ta' pteriġiofora).
- (3) Aqbad ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali li tkun inqatgħet b'pinzetta u poġġiha fuq lastra tal-ħġieġ b'diversi qtar tal-ilma. Imbagħad aghħti l-pinna anali b'għatu tal-ħġieġ. Ara li meta tkun qed taqbad il-pinna anali bil-pinzetta ma tobroxx il-proċessi papillari.
- (4) Ghodd in-numru tal-joint plate bi proċessi papillari permezz ta' kontatur taht mikroskopju bijoloġiku (mikroskopju wieqaf jew mikroskopju invertit). Il-proċessi papillari jingħarfu meta jkun hemm formazzjoni żgħira ta' proċessi vizibbli fuq in-naħa posterjuri tal-joint plate. Ikteb in-numru tal-patt

▼ **M6**

magħqud li jkollu proċessi papillari f'kull xewka tal-pinna fuq il-worksheet (eż. l-ewwel xewka tal-pinna: 0, it-tieni xewka tal-pinna: 10, it-tielet xewka tal-pinna: 12, eċċ.) u dahhal it-total ta' dan in-numru fuq l-spreadsheet tal-Excel għal kull huta individwali. Jekk ikun hemm bżonn, hu ritratt tal-pinna anali u għodd in-numru tal-*joint plate* bi proċessi papillari fuq ir-ritratt.

- (5) Wara l-kejl, poġġi l-pinna anali fit-tubu koniku deskritt f(1) u aħżnu.

Fig.1.

Dijagramma li turi differenza sesswali fil-forma u d-daqs tal-pinna anali. A, raġel; B, mara. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

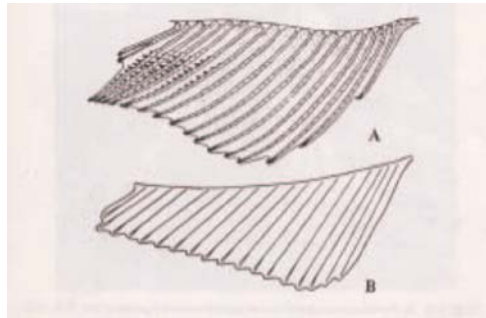
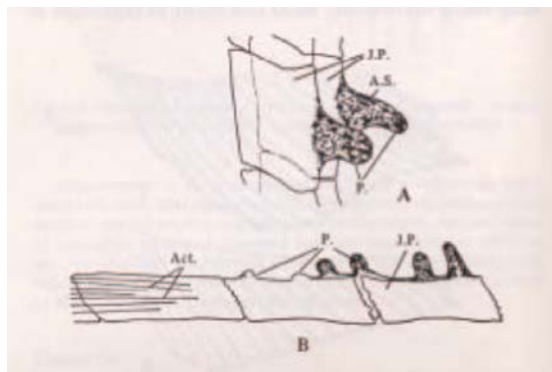


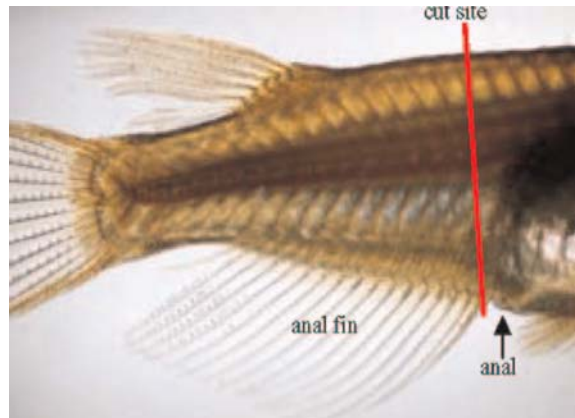
Fig.2.

A, Proċessi fuq *joint plates* ta' xewka tal-pinna anali. J.P., *joint plate*; A.S., spazju assjali; P., proċess. B, Estremità distali tax-xewka tal-pinna. L-Aktinotrikiji (Act.) qegħdin fuq il-ponta. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



▼ **M6***Fig.3.*

Ritratt tal-ġisem ta' huta li juri l-post tal-qtugħ meta l-gonada tkun iffissata fis-soluzzjoni fissattiva li mbijiex 10 % formalina newtrali bbaferjata. F'dak il-każ, il-ġisem li jifdal jinqata' bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus b'xafra (strixxa hamra), u l-parti tar-ras tal-ġisem tal-huta titqiegħed fis-soluzzjoni fissattiva għall-gonada u l-parti tad-denb ta' ġisem il-huta titqiegħed f'10 % formalina newtrali bbaferjata.



▼ **M6***Appendiċi 6***Proċeduri rakkomandati għall-ġbir ta' kampjuni għall-analiżi tal-vitellogenina**

Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontrokontaminazzjoni bejn il-kampjuni tal-VTG tal-irġiel u tan-nisa.

Proċedura 1A: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina/Arterja Kawdali

Wara li tingħata l-anestezija, il-pedunkulu kawdali jinqata' parzjalment b'xafta tal-iskarpell u d-demm jingabar mill-vina/arterja kawdali b'tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Wara li jingabar id-demm, il-plażma tiġi izolata malajr permezz ta' ċentrifugazzjoni għal 3 min f'15 000 g (jew inkella għal 10 min. f'15 000g f'temperatura ta' 4 °C). Jekk ikun mixtieq, il-persentaġġ tal-ematokrit jista' jiġi determinat wara ċ-ċentrifugazzjoni. Imbagħad il-porzjon tal-plażma jitneħħa mit-tubu mikroematokritiku u jinħażen go tubu ċentrifugu b'0,13-il unità ta' aprotinin (inibitur tal-proteazi) f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tista' ssir id-determinazzjoni tal-vitellogenina. Skont id-daqs tal-karpjun buras (li jiddependi mis-sess), il-volumi tal-plażma li jistgħu jingabru ġeneralment ivarjaw minn 5 sa 60 mikrolitru għal kull ħuta (Jensen *et al.* 2001).

Proċedura 1B: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Qalb

Inkella d-demm jista' jingabar ukoll permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa eparinizzata (1 000 unità eparina għal kull ml). Id-demm jiġi ttrasferit f'tubi Eppendorf (miżmuma fuq is-silġ) u mbagħad jiġi ċentrifugat (5 min, 7 000 g, f'temperatura ambjentali). Il-plażma għandha tiġi ttrasferita f'tubi Eppendorf nodfa (falikwoti jekk il-volum tal-plażma jippermetti li dan isir) u dlonk tiġi ffrizata f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata (Panter *et al.*, 1998).

Proċedura 2A: Medaka Ġappuniza, il-Qtugh tal-Fwied fil-Medaka

It-tneħħija tal-ħuta tat-test mill-kompartiment tat-test

- (1) Il-ħut tat-test għandu jitneħħa mill-kompartiment tat-test permezz ta' xibka żgħira f'forma ta' mġharfa (*spoon-net*). Ara li ma twaqqax il-ħut tat-test fil-kompartimenti l-oħra tat-test.
- (2) Fil-prinċipju, il-ħut tat-test għandu jitneħħa fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-oġġa konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv. Barra minn hekk, l-irġiel kollha għandhom jitneħħew minn kompartiment wiehed tat-test qabel ma jitneħħew in-nisa li jifdal.
- (3) Is-sess ta' kull ħuta tat-test jiġi identifikat abbażi tal-karatteristiċi sesswali sekondarji esterni (eż. il-forma tal-pinna anali).
- (4) Pogġi l-ħut tat-test f'reċipjent għat-trasport u gorru lejn l-istazzjon tax-xogħol għall-qtugh tal-fwied. Iċċekkja t-tikketti tal-kompartiment tat-test u tar-reċipjent tat-trasport għall-eżattezza u biex tikkonferma li l-ġħadd ta' ħut li jkun tneħħa mill-kompartiment tat-test u li l-ġħadd ta' ħut li fadal fil-kompartiment tat-test huma konsistenti ma' dak li huwa mistenni.
- (5) Jekk is-sess ma jkunx jista' jiġi identifikat mid-dehra esterna tal-ħuta, neħhi l-ħut kollu mill-kompartiment tat-test. F'dan il-każ, is-sess għandi jiġi identifikat billi jiġu osservati l-gonadi jew il-karatteristiċi sesswali sekondarji taħt mikroskopju sterjoskopiku.

▼ **M6**

Qtugh tal-fwied

- (1) Ittrasferixxi l-hut tat-test mir-reċipjent biex jiġi trasportat lejn is-soluzzjoni anestetika bix-xibka żgħira f'forma ta' mgharfa.
- (2) Wara li l-hut tat-test ikun ġie anestetizzat, ittrasferixxi l-hut tat-test fuq karta fitru (jew biċċa tal-karti) b'pinzetta (tip bażiku). Meta tkun qed iżżomm il-hut tat-test, applika l-pinzetta fuq il-ġnub tar-ras biex tevita milli tikser id-denb.
- (3) Imsah l-ilma fuq wiċċ il-huta tat-test fuq il-karta filtru (jew il-biċċa tal-karti).
- (4) Poġġi l-hut bl-addome 'l fuq. Imbagħad aghmel incizjoni trażversali żgħira bejn ir-regjun ventrali tal-ghonq u r-regjun addominali tan-nofs b'imqass tad-dissezzjoni.
- (5) Dahhal l-imqass tad-dissezzjoni fl-incizjoni ż-żgħira, u aghmel incizjoni fl-addome minn punt kawdali għall-*branchial mantle* għan-naha kranjali tal-anus tul il-linja tan-nofs tal-addome. Ara li ma dahhalx l-imqass tad-dissezzjoni wisq fil-fond biex tevita milli tagħmel hsara fil-fwied u l-gonadi.
- (6) Wettaq l-operazzjonijiet li ġejjin taht il-mikroskopju sterjoskopiku.
- (7) Poġġi l-hut tat-test bl-addome 'l fuq fuq il-biċċa tal-karti (dixx Petri tal-ħġieġ jew lastri tal-ħġieġ huma disponibbli wkoll).
- (8) Estendi l-hitan tal-kavità addominali b'pinzetta ta' preċiżjoni u ohroġ l-organi interni fuq barra. Huwa aċċettabbli wkoll li tohroġ l-organi interni fuq barra billi tneħhi naha wahda tal-hajt tal-kavità addominali jekk ikun meħtieġ.
- (9) Esponi l-parti mqabbda tal-fwied u tal-marrara b'pinzetta ohra ta' preċiżjoni. Imbagħad aqbad il-kanal tal-bili u aqta' l-marrara barra. Ara li ma tiksirx il-marrara.
- (10) Aqbad l-esofagu u bl-istess mod aqta' l-passaġġ gastrointestinali minn mal-fwied. Ara li l-kontenut tal-passaġġ gastrointestinali ma jnixxix. Aqta' l-passaġġ gastrointestinali kawdali minn mal-anus u neħhi l-passaġġ mill-kavità addominali.
- (11) Ittrimmja l-massa ta' xaham u t-tessuti l-oħrajn mill-periferija tal-fwied. Ara li ma tobroxx il-fwied.
- (12) Aqbad iż-żona portali tal-fwied permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni u neħhi l-fwied mill-kavità addominali.
- (13) Poġġi l-fwied fuq il-lastra tal-ħġieġ. Permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni, neħhi kwalunkwe xaham addizzjonali u tessut estranju (eż., ir-rita addominali), jekk ikun meħtieġ, mill-wiċċ tal-fwied.
- (14) Kejjel il-piż tal-fwied b'mikrotubu ta' 1,5 ml bhala tara permezz ta' mizien analitiku elettroniku. Irreġistra l-valur fuq il-worksheet (jinqara: 0,1 mg). Ikkonferma l-informazzjoni ta' identifikazzjoni fuq it-tikketta tal-mikrotubu.
- (15) Aghlaq l-ghatu tal-mikrotubu li fih il-fwied. Żommu mahżun fi xtilliera għat-tkessih (jew fi xtilliera tas-silġ).
- (16) Wara l-qtugh ta' fwied wiehed, naddaf l-istrumenti tad-dissezzjoni jew ibdilhom ma' oħrajn nodfa.

▼ **M6**

(17) Nehhi l-fwied mill-hut kollu fir-reċipjent tat-trasport kif deskritt hawn fuq.

(18) Wara l-qtugh tal-fwied mill-hut kollu fir-reċipjent tat-trasport (jiġifieri l-irġiel jew in-nisa kollha f'kompartiment tat-test), poġġi l-kampjuni kollha tal-fwied fi xtilliera għat-tubi b'tikketta għall-identifikazzjoni u aħzinha fil-friza. Meta l-fwied jingħata għal pretrattament f'it wara l-qtugh, il-kampjuni jittiehdu fl-istazzjon tax-xogħol li jmiss fi xtilliera għat-tkessiħ (jew fi xtilliera tas-silġ).

Wara l-qtugh tal-fwied, il-karkassa tal-huta tkun disponibbli għall-kejl tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

Kampjun

Ahżen il-kampjuni tal-fwied li ttiehdu mill-hut tat-test f'temperatura ta' ≤ -70 °C jekk ma jintużawx għall-pretrattament f'it wara l-qtugh.

Fig-1

Qatgħa eżatt wara l-pinen pettorali bi mqass.

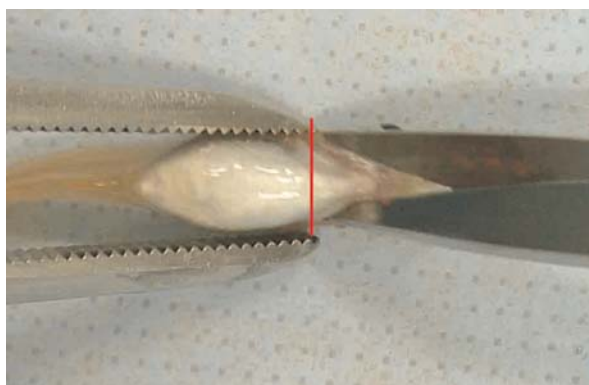


Fig-2

Inċiżjoni fil-linja tan-nofs tal-addome b'imqass sa punt madwar 2 mm kranjali għall-anu.



▼ **M6***Fig-3*

Il-hitant addominali jinferqu b'forċipi biex jiġi espost il-fwied u organi interni oħra. (Inkella, il-hitant addominali jistghu jiġu ppinjati lateralment). Il-vleġġa turi l-fwied Ovarji

*Fig-4*

Il-fwied ġie dissezżjonat u jinqata' malajr bil-forċipi.

*Fig-5*

L-intestini jinħarġu bil-galbu permezz tal-forċipi.



▼ **M6***Fig-6*

Iż-żewġ trufijiet tal-intestini u kwalunkwe appendiċi meżenterika jinqatghu bl-imqass.

*Fig-7 (mara)*

Il-proċedura hija identika għall-mara.

*Fig-8*

Il-proċedura lesta.



Proċedura 2 B: Medaka Ġappuniża (Oryzias latipes), Pretrattament tal-Fwied għall-Analiżi tal-Vitellogenina

Hu l-flixxun tal-bafer omogenat mill-kitt ELISA u keshu b'silġ imfarrak (temperatura tas-soluzzjoni: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Jekk ikun qed jintuża bafer omogenat mis-sistema EnBio ELISA, halli s-soluzzjoni toqghod f'temperatura tal-kamra, u mbagħad kessah il-flixxun bis-silġ imfarrak.

▼ M6

Ikkalkola l-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied fuq il-bażi tal-piż tiegħu (għall-omoġenat żid 50 µl ta' bafer omoġenat għal kull mg tal-piż tal-fwied). Pereżempju, jekk il-piż tal-fwied ikun ta' 4,5 mg, il-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied ikun ta' 225 µl. Hejji lista tal-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied kollu.

Thejjija tal-fwied għal pretrattament

- (1) Ohroġ il-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied mill-friza eżatt qabel it-trattament minn qabel.
- (2) Il-pretrattament tal-fwied mill-irġiel għandu jsir qabel dak tan-nisa biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-vitellogenina. Barra minn hekk, il-pretrattament għall-gruppi tat-test għandu jsir fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv.
- (3) L-għadd ta' mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom kampjuni tal-fwied meħudin mill-friza fi żmien partikolari m'għandux jaqbeż l-għadd li jista' jiġi ċentri-fugāt dak il-hin.
- (4) Irranġa l-mikrotubi ta' 1,5 ml li fihom il-kampjuni tal-fwied fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq ix-xtilliera tas-silġ (m'hemmx bżonn li l-fwied jinħall).

Operazzjoni tal-pretrattament

1. Żieda tal-bafer omoġenizzanti

- (1) Iċċekkja l-lista għall-volum tal-bafer omoġenat li se jintuża għal kampjun partikolari ta' fwied u aġġusta l-mikropipetta (medda tal-volum: 100-1 000 µl) sakemm jintlaħaq il-volum xieraq. Wahhal pont a nadifa mal-mikropipetta.
- (2) Hu l-bafer omoġenat mill-flixkun tar-reagent u żid il-bafer mal-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied.
- (3) Żid il-bafer omoġenat fil-mikrotubi kollha ta' 1,5 ml li jkun fihom il-fwied skont il-proċedura deskritta hawn fuq. M'hemmx bżonn li tibdel il-ponta tal-mikropipetta ma' wahda ġdida. Madanakollu, jekk il-ponta tkun kontaminata jew ikun hemm suspett li tkun kontaminata, il-ponta għandha tinbidel.

2. Omoġenizzazzjoni tal-fwied

- (1) Wahhal lida ġdida għall-omoġenizzazzjoni mal-omoġenizzatur tal-mikrotubu.
- (2) Dahhal il-lida fil-mikrotubu ta' 1,5 ml. Żomm l-omoġenizzatur tal-mikrotubu biex tagħfas il-fwied bejn il-wiċċ tal-lida u l-hajt intern tal-mikrotubu ta' 1,5 ml.
- (3) Haddem l-omoġenizzatur tal-mikrotubu għal 10 sa 20 sekonda. Matul l-operazzjoni kessah il-mikrotubu ta' 1,5 ml b'silġ imfarrak.
- (4) Nehhi l-lida mill-mikrotubu ta' 1,5 ml u halliha tistrieħ għal madwar 10 sekondi. Imbagħad spezzjona viżwalment l-istat tas-sospensjoni.
- (5) Jekk tara biċċiet ta' fwied fis-sospensjoni, irrepeti l-operazzjonijiet (3) u (4) biex thejji omoġenat sodisfaċenti tal-fwied.

▼ M6

(6) Kessah l-omoġenat tal-fwied sospiż fuq l-ixtilliera tas-silġ sakemm issir iċ-ċentrifugazzjoni.

(7) Biddel il-lida ma' wahda ġdida għal kull omoġenat.

(8) Omoġenizza l-fwied kollha bil-bafer omoġenat skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

3. Ċentrifugazzjoni tal-omoġenat tal-fwied sospiż

(1) Ikkonferma li t-temperatura tal-kompartiment taċ-ċentrifugazzjoni imkessah tkun ta' $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

(2) Dahhal il-mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom l-omoġenat tal-fwied sospiż f'ċentrifuga mkessha (aġġusta l-bilanċ jekk ikun hemm bżonn).

(3) Iċċentrifuga l-omoġenat tal-fwied sospiż f'13 000 g għal 10 min f'temperatura $f \leq 5^{\circ}\text{C}$. Madankollu, jekk is-supernatanti ikunu ġew separati b'mod adegwat, il-forza ċentrifuga u l-hin jistgħu jiġu aġġustati skont il-bżonn.

(4) Wara ċ-ċentrifugazzjoni, ara li s-supernatanti jkunu separati b'mod adegwat (saff tal-wiċċ: lipidu, saff intermedju: supernatant, saff tal-qiegħ: tessut tal-fwied). Jekk is-separazzjoni ma tkunx adegwata, erga' ċċentrifuga s-sospensjoni fl-istess kondizzjonijiet.

(5) Nehhi l-kampjuni kollha miċ-ċentrifuga mkessha u rrangahom fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq l-ixtilliera tas-silġ. Ara li ma terġax tissospendi kull saff li jkun ġie sseparat wara ċ-ċentrifugazzjoni.

4. Il-ġbir tas-supernatant

(1) Poġġi erba' mikrotubi ta' 0,5 ml biex fihom taħzen is-supernatant fl-ixtilliera tat-tubi.

(2) Iġbor 30 μl minn kull supernatant (separat bħala s-saff intermedju) bil-mikropipetta u poġġih f'wiehied mill-mikrotubi ta' 0,5 ml. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq is-saff tal-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

(3) Iġbor is-supernatant u qassmu fiż-żewġ mikrotubi l-oħra ta' 0,5 ml bl-istess mod kif deskritt hawn fuq.

(4) Iġbor il-bqija tas-supernatant bil-mikropipetta (jekk dan ikun jista' jsir: $\geq 100 \mu\text{l}$). Imbagħad itfa' s-supernatant fil-mikrotubu ta' 0,5 ml li jifdal. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq il-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegħ.

(5) Aghlaq l-ġhatu tal-mikrotubu ta' 0,5 ml u iktib il-volum tas-supernatant fuq it-tikketta. Imbagħad kessah minnufih il-mikrotubi fuq l-ixtilliera tas-silġ.

(6) Biddel il-ponta tal-mikropipetta b'wahda ġdida għal kull supernatant. Jekk ikun hemm ammont kbir ta' lipidu mwahhal mal-ponta, ibdilha ma' wahda ġdida minnufih biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-estratt tal-fwied bix-xaham.

(7) Qassam is-supernatant ċentrifugat kollu f'erba' mikrotubi ta' 0,5 ml skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

▼ **M6**

(8) Wara li tkun qassamt is-supernatant fil-mikrotubi ta' 0,5 ml, poġġihom kollha fl-ixtilliera tat-tubi bit-tikketta ta' identifikazzjoni, u mbagħad iffriżahom fil-frīża minnufih. Jekk il-konċentrazzjonijiet tal-VTG jitkeġġu eżatt wara l-pretrattament, żomm mikrotubu wieħed ta' 0,5 ml (li fih 30 µl ta' supernatant) kiesaħ fl-ixtilliera tat-tubi u ttrasferixxih fl-istazzjon tax-xogħol fejn se jsir l-assaġġ ELISA. F'dan il-każ, poġġi l-mikrotubi li fadal fl-ixtillieri tat-tubi u ffrizahom fil-frīża.

(9) Wara li tiġbor is-supernatant, armi l-fdalijiet b'mod adegwat.

Hażna tal-kampjun

Ahżen il-mikrotubi ta' 0,5 ml li jkun fihom is-supernatant tal-omoġenat tal-fwied f'temperatura ta' $\leq -70^{\circ}\text{C}$ sakemm jintużaw għall-ELISA.

Proċedura 3A: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina / Arterja Kawdali

Eżatt wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' b'mod trażversali, u d-demm jittiehed mill-vina/arterja kawdali permezz ta' tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Il-volumi tad-demm ivarjaw minn 5 sa 15 µl skont id-daqs tal-huta. Mat-tubu mikrokapillari jiżdied volum indaqs ta' bafer ta' aprotinin (6 µg/ml f'PBS), u l-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (5 minuti b'600 g). Il-plażma tiġi għar fit-tubi tat-test u tinħażen f'temperatura ta' -20°C sakemm tiġi analizzata għall-vitellogenina jew għal proteini oħrajn ta' interess.

Proċedura 3B: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm permezz ta' Titqiba fil-Qalb

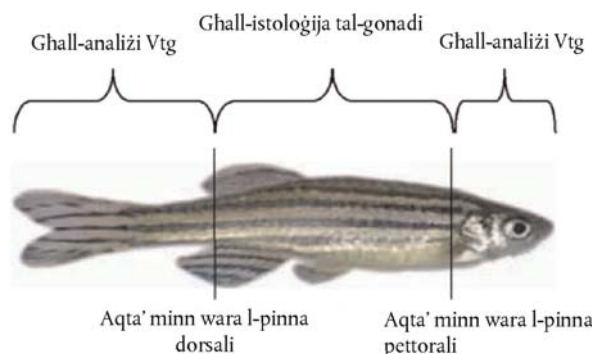
Biex jiġi evitat milli d-demm jikkoagula u l-proteini jiddegradaw, il-kampjuni jinġabru f'bafer ta' salina b'bafer tal-Fosfat (PBS) li jkun fih eparina (1 000 unità/ml) u l-inibitur tal-proteazi aprotinin (2 TIU/ml). Bħala ingredjenti għall-bafer, huma rrakkomandati melh tal-ammonijaka-eparina, u aprotinin lijoofilizzat. Għall-kampjunar tad-demm, hija rrakkomandata siringa (1 ml) b'labra fissa rqiqqa (eż. Braun Omnican-F). Is-siringa għandha timtela minn qabel b'bafer (madwar 100 µl) biex il-volumi żgħar tad-demm minn kull huta jitnehhew kompletament. Il-kampjuni tad-demm jittiehdu permezz ta' titqiba fil-qalb. L-ewwel il-hut għandu jiġi anestetizzat b'MS-222 (100 mg/l). Il-pjan xieraq ta' anestezija jippermetti sabiex l-utent jiddistingwi t-taħbita tal-qalb taż-żebra. Waqt li tkun qed ittaqqab il-qalb, żomm il-pistun tas-siringa taħt pressjoni baxxa. Il-volumi tad-demm li jistgħu jinġabru jvarjaw bejn 20 — 40 mikrolitru. Wara t-titqiba tal-qalb, it-taħlita tad-demm/bafer għandha tintefa' fit-tubu tat-test. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (20 min; 5 000 g) u għandha tinħażen f'temperatura ta' -80°C sakemm tkun meħtieġa għall-analiżi.

Proċedura 3C: SOP: Żebra, l-omoġenizzazzjoni tar-ras u d-denb

(1) Il-hut jiġi anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.

(2) Ir-ras u d-denb jinqatgħu mill-huta skont il-Figura 1.

Importanti: L-istrumenti kollha tad-dissezzjoni, u l-injama tat-tqattigh għandhom jitlaħhalu u jitnaddfu sew (eż. b'96 % etanol) bejn l-immaniġġjar ta' kull huta biex jiġi evitat "tniġġis tal-vitellogenina" minn nisa jew irġiel indotti lil irġiel li ma ġewx indotti.

▼ **M6***Figura 1*

- (3) Il-piż ikkombinat tar-ras u d-denb minn kull ħuta jitkejjel sal-eqreb mg.
- (4) Wara li jintiżnu, il-partijiet jitpoġġew f'tubi adattati (eż. Eppendorf ta' 1,5 ml) u jiġu ffrizzati f' - 80 °C sakemm jiġu omoġenizzati jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistilli tal-plastik. (Jistghu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). Importanti: It-tubi għandhom jiġu enumerati sew sabiex ir-ras u d-denb mill-ħuta jkunu jistghu jiġu relatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istologija gonadali.
- (5) Meta tintlaħaq massa omoġena, jiżdied bafer omoġenizzanti (*) kiesaħ silġ li jkun 4 darbiet il-piż tat-tessut. Kompli aħdem bil-pistili sakemm it-tahlita tkun omoġenja. Nota importanti: Għal kull ħuta jintużaw pistili ġodda.
- (6) Il-kampjuni jitqiegħdu fuq is-silġ sakemm issir ċentrifugazzjoni f'4 °C b'50 000 × g għal 30 min.
- (7) Uża pipetta biex tqassam porzjonijiet ta' 20 µl ta' supernatant f'mill-inqas żewġ tubi billi tgħaddas il-ponta tal-pipetta taħt is-saff tax-xaħam fuq il-wiċċ u tiġbed bil-mod is-supernatant mingħajr frazzjonijiet ta' xaħam jew ta' gerbub.
- (8) It-tubi jinħażnu f' - 80 °C sakemm jiġu biex jintużaw.

(*) **Bafer omoġenizzanti:**

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Koktejl ta' inibituri tal-proteazi (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Koktejl ta' inibituri tal-proteazi.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) eż. minn Bie & Berntsen, id-Danimarka.
- Koktejl ta' inibituri tal-proteazi: Minn Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott P 8340.
- *Nota:* Il-bafer omoġenizzanti għandu jintuża dakinhar stess meta jiġi manifatturat. Poġġi fuq is-silġ waqt li jkun qed jintuża.

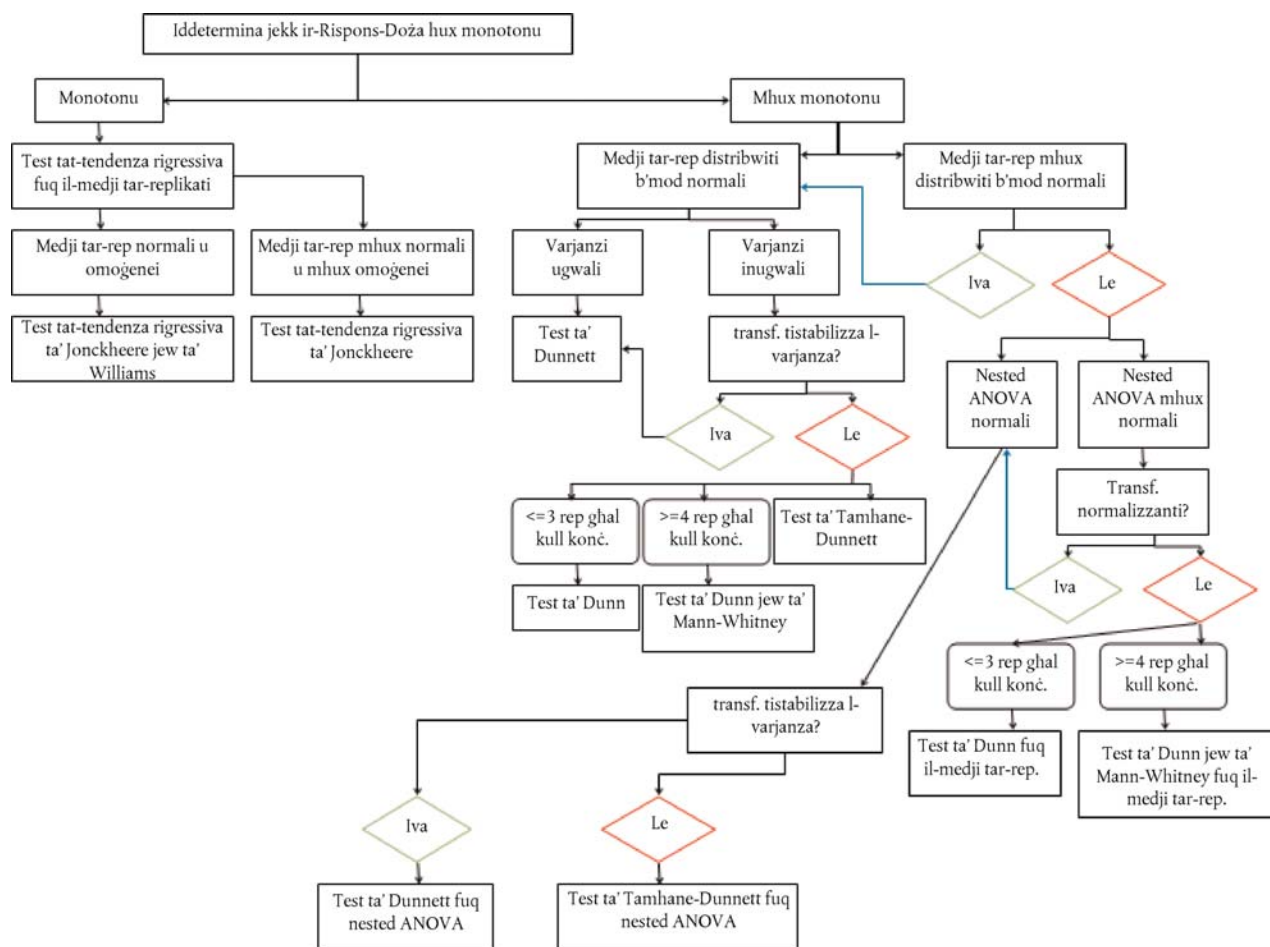
▼ **M6***Appendiċi 7***Kampjuni b'fortifikazzjoni ta' vitelloġenina u standard ta' referenza interassaġġ**

F'kull jum li jsiru l-assaġġi tal-vitelloġenina, irid jiġi analizzat kampjun taż-żieda magħmul permezz ta' standard ta' referenza interassaġġ. Il-vitelloġenina użata biex isir l-istandard ta' referenza interassaġġ għandha tkun minn lott differenti minn dak użat għat-thejjija ta' standards tal-kalibraġġ għall-assaġġ imwettaq.

Il-kampjun taż-żieda se jittiehed billi tiżdied kwantità magħrufa tal-istandard interassaġġ ma' kampjun ta' plazma tal-irġiel tal-kontroll. Il-kampjun se jiġi miżjud sabiex tinkiseb konċentrazzjoni tal-vitelloġenina bejn 10 u 100 darba l-konċentrazzjoni mistennija tal-vitelloġenina tal-hut maskili ta' kontroll. Il-kampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll li huwa miżjud jista' jittiehed minn huta waħda jew jista' jkun ġej minn diversi hut.

Sottokampjun tal-plażma tal-irġiel tal-kontroll mhux miżjud se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ *wells* duplikati. Il-kampjun miżjud se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ *wells* duplikati wkoll. Il-kwantità medja tal vitelloġenina fiż-żewġ kampjuni tal-plażma mhux miżjud tal-irġiel tal-kontroll tiżdied mal-kwantità kkalkolata tal-vitelloġenina miżjud taż-żieda tal-kampjuni biex tiġi determinata konċentrazzjoni mistennija. Il-proporzjon ta' din il-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla ser jiġi rrapportat flimkien mar-rizultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

Flowchart deċiżjonali għall-analiżi statistika



▼ M6

C.38. L-ASSAĠĠ TAL-METAMORFOSI TAL-AMFIBJI

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 231 tal-OECD (2009). Il-htieġa ta' żvilupp u validazzjoni ta' assaġġ li kapaċi jidentifika sustanzi kimiċi attivi fis-sistema tat-tirojde ta' speċijiet vertebrati ġejja mit-thassib fuq il-fatt li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkawgħaw effetti avversi kemm fuq il-bniedem kif ukoll fuq l-organizmi slavaġ. Fl-1998, l-OECD nediet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi t-TGs eżistenti u tiżviluppa TGs godda għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' sustanzi potenzjali li jfixxlu s-sistema endokrinali. Element tal-attività kien li tiġi żviluppata TG għat-tgħarbil tas-sustanzi kimiċi attivi fis-sistema tat-tirojde ta' speċijiet vertebrati. Ġew proposti kemm tishih tal-Istudju dwar it-tossicità b'doża orali ripetuta ta' 28 jum (Kapitlu B.7 ta' dan l-Anness) kif ukoll l-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA). Il-metodu ta' ttestjar imsaħħah B.7 ġie vvalidat u nħareġ metodu ta' ttestjar rivedut. L-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA) ġie soġġett għal programm estensiv ta' validazzjoni li kien jinkludi studji intra u interlaboratorji li wrew ir-relevanza u l-affidabilità tal-assaġġ (1, 2). Imbagħad, il-validazzjoni tal-assaġġ giet soġġetta għal evalwazzjoni bejn il-pari minn panil ta' esperti indipendenti (3). Dan il-metodu ta' ttestjar huwa r-riżultat tal-esperjenza miksuba matul l-istudji ta' validazzjoni għall-identifikazzjoni tas-sustanzi attivi fit-tirojde, u tal-hidma mwettqa fi mkejjen ohra f'pajjiżi membri tal-OECD.

PRINĊIPJU TAT-TEST

2. L-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji (AMA) huwa assaġġ ta' tgħarbil maħsub sabiex jidentifika b'mod empiriku dawk is-sustanzi kimiċi li jistgħu jfixxlu mal-funzjoni normali tal-assi ipotalamiku-pitwitarju-tirojde (HPT). L-AMA jirrappreżenta mudell iġġeneralizzat tal-vertebrati sal-punt li huwa bbażat fuq l-istrutturi u l-funzjonijiet miżmumin tal-assi HPT. Huwa assaġġ importanti għaliex il-metamorfosi tal-amfibji tipprovdi proċess studjat sew li jiddependi fuq it-tirojde li jirrispondi għal sustanzi kimiċi attivi fi hdan l-assi HPT, u huwa l-uniku assaġġ eżistenti li jidentifika attività fit-tirojde f'annimal li jkun għaddej minn żvilupp morfologiku.
3. Id-disinn sperimentali ġenerali jinvolvi l-espożizzjoni ta' mrieżeb *Xenopus laevis* fl-istadju 51 għal minimu ta' tliet konċentrazzjonijiet differenti ta' sustanza kimika tat-test u kontroll tal-ilma ta' dilwizzjoni għal 21 jum. Hemm erba' rreplikati ta' kull trattament tat-test. Id-densità tal-larva fil-bidu tat-test hija ta' 20 marżebba għal kull tank tat-test għall-gruppi kollha tat-trattament. Il-punti ta' tmiem osservazzjonali huma t-tul tas-sieq ta' wara, it-tul mill-immieher sal-anus (SVL), l-istadju ta' żvilupp, il-piż imxarrab, l-istologija tat-tirojde, u osservazzjonijiet ta' kuljum tal-mortalità.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Speċijiet tat-Test

4. *Xenopus laevis* hija kkolturata b'rutina fl-laboratorji madwar id-dinja u faċli tinkiseb mingħand fornituri kummerċjali. Ir-riproduzzjoni malajr tista' tiġi indotta f'din l-ispeċi tul is-sena billi jintużaw tilqimiet tal-gonadotrofina korjonika umana (hCG) u l-larva li tirriżulta tista' titrabba b'rutina sal-istadji ta' żvilupp magħżulin f'numri kbar biex ikunu jistgħu jintużaw protokoll tat-testijiet speċifiċi għall-istadju. Idealment il-larva użata

▼ M6

fl-assaġġ tingieb minn adulti mrobbijin fl-istess post. Għad li din mhijiex il-proċedura ideali, hemm l-alternattiva li l-bajd jew l-embriji jistghu jintbagħtu lil-laboratorju li jagħmel it-test u jithallew iderru; mhuwiex aċċettabbli li jintbagħtu stadji ta' larva għall-użu fit-test.

Tagħmir u Provvisti

5. It-tagħmir u l-provvisti li ġejjin huma meħtieġa sabiex isir dan l-assaġġ:

- a) Sistema ta' espożizzjoni (ara d-deskrizzjoni iktar 'l isfel);
- b) Akkwariji tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli (ara d-deskrizzjoni iktar 'l isfel);
- c) Tankijiet għat-tgħammir;
- d) Apparat għall-kontroll tat-temperatura (eż., ħiters jew berrieda (aġġustabli sa $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$));
- e) Termometru;
- f) Mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari;
- g) Kamera diġitali b'riżoluzzjoni minima ta' 4 megapixels u mikrofunzjoni;
- h) Software għad-diġitizzazzjoni tal-istampi;
- i) Dixx petri (eż. $100 \times 15 \text{ mm}$) jew kompartiment tal-plastik trasparenti ta' daqs paragunabbli;
- j) Mizien analitiku li kapaċi jkejjel sa 3 punti deċimali (mg);
- k) Metru tal-ossigenu dissolt;
- l) Metru tal-pH;
- m) Metru tal-intensità tad-dawl li kapaċi jkejjel f'unitajiet lux;
- n) Għodod u oġġetti tal-ħġieġ mixxelanji tal-laboratorju;
- o) Pipetti aġġustabbli (10 sa 5 000 μl) jew pipetti varji ta' daqsijiet ekwivalenti;
- p) Sustanza kimika tat-test f'biżżejjed kwantitajiet sabiex isir l-istudju, idealment lott waħda;
- q) Strumentizzazzjoni analitika xierqa għas-sustanza kimika tat-test jew servizzi analitiċi kkuntrattati.

Testabilità tas-Sustanza Kimika

6. L-AMA huwa bbażat fuq protokoll ta' espożizzjoni milwiema li bih is-sustanza kimika tat-test tiddaħhal fil-kompartimenti tat-test permezz ta' sistema bi fluss kontinwu. Madankollu, il-metodi bi fluss kontinwu jġibu magħhom restrizzjonijiet fuq it-tipi ta' sustanzi kimiċi li jistghu jiġu ttestjati, kif stabbilit mill-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika. Għaldaqstant, qabel ma jintuza dan il-protokoll għandha tinkiseb informazzjoni tax-xenarju bazi dwar is-sustanza kimika li tkun relevanti sabiex tiġi stabbilita t-testabilità, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Itestjar tat-Tossiċità Akwatika ta' Sustanzi u Tahlitiet

▼ M6

Diffiċli (4). Il-karatteristiċi li jindikaw li s-sustanza kimika tista' tkun diffiċli li tiġi ttestjata f'sistemi akkwatiċi jinkludu: koeffiċjenti għoljin ta' partizzjoni ottanol/ilma ($\log K_{ow}$), volatilità għolja, suxxettibilità għal idrolizi, u suxxettibilità għal fotolizi f'kundizzjonijiet ta' dawl tal-laboratorju ambjentali. Sabiex tiġi stabbilita t-testabilità jista' jkun hemm fatturi rilevanti oħrajn, li għandhom jiġu stabbiliti fuq bażi ta' każ b'każ. Jekk ma jkunx possibbli li tintuża b'suċċess sistema ta' ttestjar bi fluss kontinwu għas-sustanza kimika, tista' tithaddem sistema ta' tiġdid statiku. Jekk l-ebda sistema ma tkun kapaċi takkomoda s-sustanza kimika tat-test, f'dak il-każ l-għażla predefinita hija li ma tiġix ittestjata billi jintuża dan il-protokoll.

Sistema ta' Espożizzjoni

7. Sistema ta' dilwitur bi fluss kontinwu hija ppreferita, meta tkun possibbli, meta mqabbla ma' sistema ta' tiġdid statiku. Jekk karatteristiċi fiżiċi u/jew kimiċi ta' xi waħda mis-sustanzi kimiċi tat-test ma jkunux adattati għal sistema ta' dilwitur bi fluss kontinwu, f'dak il-każ tista' tintuża sistema ta' espożizzjoni alternattiva (eż., b'tiġdid statiku). Il-komponenti tas-sistema għandu jkollhom komponenti li jmissu mal-ilma tal-ħġiegħ, tal-azzar inossidabbli u/jew tal-Politetrafluoroetilen. Madankollu, jistgħu jintużaw materjali xierqa tal-plastik jekk ma jkunux ta' xkiel għall-istudju. It-tankijiet ta' espożizzjoni għandhom ikunu akkwarij tal-ħġiegħ jew tal-azzar inossidabbli mgħammrin b'pajpijiet wiqfin li jirriżultaw f'volum tat-tank ta' bejn 4,0 u 10,0 l u fond minimu tal-ilma ta' bejn 10 u 15-il cm. Is-sistema għandha tkun tiflaħ għall-koncentrazzjonijiet tal-espożizzjoni kollha u kontroll, b'erba' replikati għal kull trattament. Ir-rata tal-fluss għal kull tank għandha tkun kostanti wara li jingħata kont kemm liż-zamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll lill-espożizzjoni kimika (eż. 25 ml/min). It-tankijiet tat-trattament għandhom jiġu assenjati għal għarrieda għal pożizzjoni fis-sistema ta' espożizzjoni sabiex jitnaqqsu l-effetti pożizzjonali potenzjali, inkluzi ċaqliqiet żgħar fit-temperatura, l-intensità tad-dawl, eċċ. Għandu jintuża dawl fluworexxenti sabiex jiġi pprovut fotoperjodu ta' 12-il siegħa dawl: 12-il siegħa dlam b'intensità li tvarja bejn 600 u 2 000 lux (lumen/m^2) f'wiċċ l-ilma. It-temperatura tal-ilma għandha tinżamm fi $22^\circ \pm 1^\circ \text{C}$, il-pH tinżamm bejn 6,5 u 8,5, u l-koncentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt (DO) $> 3,5 \text{ mg/l}$ ($> 40\%$ tas-saturazzjoni tal-arja) f'kull tank tat-test. Tal-inqas, it-temperatura tal-ilma, il-pH u l-ossiġenu dissolt għandhom jitkejlu darba fil-ġimgħa; idealment it-temperatura titkejje b'mod kontinwu f'tal-inqas reċipjent wieħed tat-test. L-Appendiċi 1 jispjega l-kundizzjonijiet sperimentali li fihom għandu jiġi eżegwit il-protokoll. Għal iktar informazzjoni dwar kif jiġu stabbiliti sistemi ta' espożizzjoni bi fluss kontinwu u/jew sistemi ta' tiġdid statiku, jekk jogħġbok irreferi għall-Gwida Standard tal-ASTM għat-Twettiq ta' Testijiet tat-Tossicità Akuta fuq Materjali tat-Test b'Hut, Makroinvertebrati, u Amfibji (5) u testijiet tat-tossokoloġija akkwatika ġenerali.

Kwalità tal-ilma

8. Jista' jintuża kwalunkwe ilma li huwa disponibbli lokalment (eż. ilma tan-nixxiegħa jew ilma tal-vit iffiltrat għall-karbonju) u li jippermetti tkabbir u żvilupp normali tal-imrieżeb. Peress li l-kwalità tal-ilma lokali tista' tvarja b'mod sostanzjali bejn zona u oħra, għandha tiġi analizzata l-kwalità tal-ilma, b'mod partikolari jekk ma jkunx hemm disponibbli dejta storika dwar l-użu tal-ilma għat-trobbija ta' *Xenopus*. Għandha tingħata attenzjoni speċjali għall-fatt li l-ilma jkun hieles minn ram, kloru u kloramini, li kollha huma tossiċi għal żringijiet u mrieżeb. Huwa rrakkomandat ukoll li jiġi analizzat l-ilma fid-dawl tal-livelli ta' sfond ta' fluworur, perkolat u klorat

▼ M6

(prodotti sekundarji tad-dizinfazzjoni tal-ilma tajjeb għax-xorb) peress li dawn l-anjoni kollha huma substrati tat-trasportatur tal-jodju tal-glandola tat-tirojde u livelli għoljin ta' kull wiehed minn dawn l-anjoni jista' jfixxkel l-eżitu tal-istudju. Għandha ssir analiżi qabel ma jibdwu it-testijiet u, normalment, l-ilma tat-testijiet għandu jkun hieles minn dawn l-anjoni.

Konċentrazzjoni ta' Jodur fl-Ilma tat-Test

9. Sabiex il-glandola tat-tirojde tissintetizza t-TH, irid jitqiegħed għad-dispożizzjoni biżżejjed jodur għal-larva permezz ta' tahlita ta' sorsi milwiema u djetetiċi. Bhalissa, ma hemm ebda linja gwida derivata b'mod empiriku għal konċentrazzjonijiet minimi ta' jodur. Madankollu, id-disponibilità tal-jodur tista' taffettwa r-risponsività tas-sistema tat-tirojde għal aġenti attivi fit-tirojde u hija magħrufa li timmodula l-attività tal-baži tal-glandola tat-tirojde, aspett li jisthoqqlu attenzjoni meta jiġu interpretati r-riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde. Għaldaqstant, għandhom jiġu rrapportati l-konċentrazzjonijiet tal-jodur milwiema mkejlin mill-ilma tat-test. Fuq il-baži tad-dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni, intwera li l-protokoll jahdem sew meta l-konċentrazzjonijiet tal-jodur tal-ilma tat-test (I⁻) varjaw bejn 0,5 u 10 µg/l. Idealment, il-konċentrazzjoni minima tal-jodur fl-ilma tat-test għandha tkun ta' 0,5 µg/l. Jekk l-ilma tat-test jiġi rikostitwit minn ilma dejonizzat, il-jodju għandu jiżdied b'konċentrazzjoni minima ta' 0,5 µg/l. Kwalunkwe suppliment addizzjonali tal-ilma tat-test bil-jodju jew melhiet oħrajn għandu jitnizzel fir-rapport.

Żamma tal-annimali

Tgħammir u Indukrar tal-Adulti

10. It-tgħammir u l-indukrar tal-adulti jsiru skont il-linji gwida standard u huwa ssuġġerit li l-qarrej jaqra l-gwida standard għat-twettiq tal-Assaġġ tat-Teratogenezi tal-Embriji taż-Żringijiet (FETAX) (6) għal iktar informazzjoni ddettaljata. It-tali linji gwida standard jipprovdu eżempju ta' metodi xierqa ta' indukrar u tgħammir, iżda ma hemmx bżonn ta' aderenza stretta. Biex jiġi pprovokat it-tgħammir, pari (3-5) ta' nisa adulti u rġiel jiġu injettati b'gonadotrofina korjonika umana (hCG). L-eżemplari nisa u rġiel huma injettati b'madwar 800 IU-1 000 IU u 600 IU-800 IU, rispettivamente, ta' hCG dissolta f'soluzzjoni salmastra ta' 0,6-0,9 % Il-pari għat-tgħammir jinżammu ftankijiet kbar, mhux disturbati u f'kundizzjonijiet statiči sabiex tiġi promossa l-amplessi. Il-qieġh ta' kull tank tat-tgħammir għandu jkollu qieġh falz ta' xibka tal-azzar inossidabbli jew tal-plastik li jippermetti sabiex il-mases tal-bajd jaqgħu f'qieġh it-tank. Iz-żringijiet injettati iktar tard waranofsinar normalment jiddepożitaw hafna mill-bajd tagħhom sa nofs il-ghodwa tal-ghada. Wara li tinheles u tiġu ffertilizzata kwantità suffiċjenti ta' bajd, l-adulti għandhom jitnehhew mit-tankijiet tat-tgħammir.

Indukrar u Għażla tal-Larva

11. Wara li l-adulti jitnehhew mit-tankijiet tat-tgħammir, il-bajd jingabar u jiġi evalwat għall-vijabbiltà billi jintuza subsetta rappreżentattiva tal-embriji mit-tankijiet kollha tat-tgħammir. L-aħjar bajd individwali tal-hut (irakkomandati 2-3 biex tiġi evalwata l-kwalità tal-bajd tal-hut) għandu jinżamm fuq il-baži tal-vijabbiltà tal-embriji u l-preżenza ta' numru adegwat (tal-inqas 1 500) ta' embriji. L-organizmi kollha użati fi studju għandhom ikunu gejjin minn avveniment ta' riproduzzjoni wiehed (jiġifieri l-bajd ma għandux ikun komhallat). L-embriji huma ttrasferiti f'dixx jew tagen ċatt kbir u l-bajd ovvu mejjet jew anormali (ara d-definizzjoni f'(5)) jitneħħa bl-użu ta' pipetta jew kontagoċċi. L-embriji b'saħħithom minn kull wiehed minn dawn l-avvenimenti ta' riproduzzjoni jiġu ttrasferiti fi tliet tankijiet

▼ M6

separati għat-tifqis. Erbat ijiem wara li jitqiegħed fit-tankijiet għat-tifqis, jingħazel l-aħjar bajd, fuq il-bażi tal-vijabilità u s-suċċess tat-tifqis, u l-larva tiġi ttrasferita f'numru xieraq ta' tankijiet tat-trobbija fi $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Barra minn hekk, ċerta larva addizzjonali titqiegħed f'tankijiet żejda sabiex tintuża bħala sostituta f'każ li jmutu whud fit-tankijiet tat-trobbija matul l-ewwel ġimgħa. Din il-proċedura żżomm densità konsistenti tal-organizmi u b'hekk tnaqqas id-diverġenza fl-iżvilupp fi hdan il-koorta ta' avveniment wiehed ta' riproduzzjoni. It-tankijiet kollha tat-trobbija għandhom jitbattlu u jitnaddfu kuljum. Bħala prekawzjoni, huma ppreferuti ngwanti tal-vinil jew tan-nitril u mhux ingwanti tal-latex. Il-mortalitajiet għandhom jitnehhew ta' kuljum u għandha tiżdied il-larva ta' sostituzzjoni sabiex tinzamm id-densità tal-organizmi matul l-ewwel ġimgħa. It-tmigh għandu jsir tal-inqas darbtejn kuljum.

12. Matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni, l-imrieżeb iderru fil-kundizzjonijiet tal-fażi propja ta' espożizzjoni, inklużi t-tip ta' ikel, it-temperatura, iċ-ċiklu ta' dawl-dlam u l-midjum għall-kultura. Għaldaqstant, huwa rrakkomandat li jintuża l-istess ilma tal-kultura/dilwizzjoni matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni u l-fażi ta' espożizzjoni. Jekk tintuża sistema ta' kultura statika għaž-żamma tal-imrieżeb matul il-fażi ta' qabel l-espożizzjoni, il-midjum għall-kultura għandu jitbiddel kompletament tal-inqas darbtejn fil-ġimgħa. Ifffullar, ikkaġunat minn densitajiet għoljin ta' larva matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni, għandu jiġi evitat għaliex it-tali effetti jistgħu jaffetwaw mhux f'tit l-iżvilupp tal-imrieżeb matul il-fażi sussegwenti ta' ttestjar. Għaldaqstant, id-densità tat-trobbija ma għandhiex taqbeż bejn wiehed u iehor l-erba' mrieżeb/l midjum għall-kultura (sistema ta' espożizzjoni statika) jew l-10 imrieżeb/l midjum għall-kultura (b'eż. rata ta' fluss ta' 50 ml/min fis-sistema ta' qabel l-espożizzjoni jew tal-kultura). F'dawn il-kundizzjonijiet, l-imrieżeb għandhom jiżviluppaw mill-istadji 45/46 sal-istadju 51 fi żmien tnax-il jum. L-imrieżeb rappreżentattivi ta' din il-popolazzjoni tal-istokkijiet għandhom jiġu spezzjonati kuljum għall-istadju ta' żvilupp sabiex jiġi stmat il-punt ta' żmien xieraq għall-bidu tal-espożizzjoni. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġu mminimizzati l-istress u t-trauma għall-imrieżeb, speċjalment matul iċ-ċaqliq, it-tindif tal-akkwarji, u l-manipolazzjoni tal-larva. Għandhom jiġu evitati kundizzjonijiet/attivitàjiet ta' stress bħal hsejjes storbużi u/jew bla heda, taptip fuq l-akkwarji, vibrazzjonijiet fl-akkwarji, attività żejda fil-laboratorju, u bidliet rapidi fil-midjums ambjentali (disponibilità ta' dawl, temperatura, pH, DO, rati tal-fluss tal-ilma, eċc.) Jekk l-imrieżeb ma jiżviluppawx sal-istadju 51 fi żmien 17-il jum wara l-fertilizzazzjoni, stress eċċessiv għandu jitqies bħala kaġuni potenzjali.

Kultura u Tmigh tal-Larva

13. L-imrieżeb jintemgħu, pereżempju, b'għalf kummerċjali għall-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni (ara l-appendiċi 1 ukoll) matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni (wara l-istadju 45/46 ta' Nieuwkoop u Faber (NF) (8)) u matul il-perjodu shiħ tat-test ta' 21 jum, jew dieta oħra li wriet li tilhaq prestazzjoni ekwivalenti bħall-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji. Ir-regim tat-tmigh matul il-perjodu ta' qabel l-espożizzjoni għandu jiġi aġġustat bir-reqqa biex jissodisfa l-htigijiet tal-imrieżeb li qed jiżviluppaw. Jiġifieri, għandhom jiġu pprovduti porzjonijiet żgħar ta' ikel lill-imrieżeb li faqqsu bosta drabi kuljum (tal-inqas darbtejn). Ikel żejjed għandu jiġi evitat sabiex *i)* tinzamm il-kwalità tal-ilma u *ii)* jiġi evitat milli jinstaddu l-filtri tal-gargi b'partikoli u frak tal-ikel. Għall-għalf tal-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni, il-porzjonijiet tal-ikel ta' kuljum

▼ M6

għandhom jiżiedu flimkien mat-tkabbir tal-imrieżeb għal madwar 30 mg/animali/jum f'it qabel jinbeda t-test. Fl-istudji ta' validazzjoni ntweru li dan l-għalf kummerċjalment disponibbli jsostni t-tkabbir u l-iżvilupp xierqa ta' mrieżeb *X. laevis*, u huwa magħmul minn partikoli fini li jibqgħu sospiżi fil-kolonna tal-ilma għal perjodu twil ta' żmien u huwa soġġett li jhroġ mal-fluss. Għaldaqstant, l-ammont totali ta' ikel ta' kuljum għandu jinqasam f'porzjonijiet żgħir u jingħata tal-inqas darbtejn kuljum. Għal dan it-tmigh, ir-reġim tat-tmigh huwa spjegat fit-Tabella 1. Ir-rati tat-tmigh għandhom jiġu rreġistrati. Jista' jintema' xott jew bħala soluzzjoni ewlenija mhejjija filma ta' dilwizzjoni. Soluzzjoni ewlenija bħal din għandha tithejja għidha kull jumejn u tinħażen f'4 °C meta ma tintużax.

Tabella 1.

Ir-reġim tat-tmigh b'għalf kummerċjali għall-imrieżeb użat fl-istudji ta' validazzjoni għal imrieżeb *X. laevis* matul il-porzjon tul il-hajja tal-AMA f'kundizzjonijiet bi fluxs kontinwu

Jum tal-Istudju	Porzjon tal-ikel (mg għalf/animal/jum)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Kimika Analitika

14. Qabel ma jsir studju, għandha tiġi evalwata l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test billi tintuża l-informazzjoni eżistenti dwar is-solubilità, id-degradabilità u l-volatilità tagħha. Is-soluzzjonijiet tat-test minn kull tank irreplikati f'kull konċentrazzjoni għandhom jiġu kampjunati għal analizzazzjoni kimika analitika fil-bidu tat-test (jum 0), u kull ġimgħa matul it-test għal tal-inqas erba' kampjuni. Huwa rakkomandat ukoll li kull konċentrazzjoni tat-test tiġi analizzata matul it-tnejn tas-sistema, qabel jibda t-test, sabiex tiġi vverifikata l-prestazzjoni tas-sistema. Barra minn hekk, huwa rakkomandat li s-soluzzjonijiet ewlenin jiġu analizzati meta jinbidlu, speċjalment jekk il-volum tas-soluzzjoni ewlenija ma jipprovdix ammonti adegwati tas-sustanza kimika biex iservu għad-durata tal-perjodi ta' kampjunar ta' rutina. Fil-każ ta' sustanzi kimika li ma jistgħux jiġu identifikati fuq mill-konċentrazzjonijiet użati f'test jew f'kollha kemm huma, is-soluzzjonijiet ewlenin għandhom jitkejlu u r-rati tal-fluss tas-sistema għandhom jiġu rreġistrati sabiex jiġu kkalkolati l-konċentrazzjonijiet nominali.

Twassil tas-Sustanza Kimika

15. Il-metodu użat biex is-sustanza kimika tat-test tiddaħhal fis-sistema jista' jvarja skont il-karatteristiċi fizikokimika tagħha. Sustanzi kimika li jinhallu fl-ilma jistgħu jiġu dissolti f'alkwoti tal-ilma tat-test f'konċentrazzjoni li tippermetti t-twassil bil-konċentrazzjoni tat-test fil-mira f'sistema bi fluxs kontinwu. Sustanzi kimika li huma likwidi f'temperatura ambjentali u f'it li xejn jinhallu fl-ilma jistgħu jiddaħhlu bl-użu ta' likwidu: metodi ta' saturatur tal-likwidu. Sustanzi kimika li huma solidi f'temperatura ambjentali u li f'it li xejn jinhallu fl-ilma jistgħu jiddaħhlu bl-użu ta' saturatur tal-kolonna tal-ħġieġ f'forma ta' fibri (7). Idealment tintuża sistema tat-test mingħajr trasportatur, iżda sustanzi kimika tat-test differenti ser ikollhom karatteristiċi fizikokimika diversi li aktarx ser ikunu jehtieġu approċċi differenti għat-tnejn ta' ilma ta' espożizzjoni kimika. Ahjar isir sforz sabiex

▼ M6

jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: *i*) ċerti solventi nfushom jistgħu jirrizultaw f'tossiċità u/jew risponsi endokrinoloġiċi mhux misten-nija jew mhux mixtieqa, *ii*) l-ittestjar tas-sustanzi kimiċi 'il fuq mis-solubilità tal-ilma tagħhom (kif spiss jista' jsehh meta jintużaw solventi) jista' jirrizulta f'determinazzjonijiet imprecizi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, u *iii*) l-użu ta' solventi f'testijiet iktar fit-tul jista' jirrizulta fi grad importanti ta' "biofilming" assoċjat ma' attività mikrobika. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, jista' jintuża solvent bħala l-aħhar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akkwatika ta' sustanzi u tahlitiet diffiċli (4) sabiex jiġi stabbilit l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent ser tiġi stabbilita mill-karatteristiċi kimiċi tas-sustanza kimika. Solventi li nstab li huma effettivi għall-ittestjar tat-tossiċità akkwatika inkluż l-aċetun, l-etanol, il-metanol, id-dimetilformamid u t-trietilen glikol. Jekk jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet tas-solvent għandhom ikunu inqas mill-Konċentrazzjoni Mingħajr Effetti Osservabbli (NOEC) kronika; id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' 100 µl/l; reviżjoni riċenti tirrakkomanda li jintużaw konċentrazzjonijiet tas-solvent li jinżlu sa 20 µl/l ilma ta' dilwizzjoni (12). Jekk jintużaw trasportaturi tas-solvent, għandhom jiġu evalwati kontrolli xierqa tas-solvent minbarra kontrolli mhux tas-solvent (ilma nadif). Jekk mhuwiex possibbli li sustanza kimika tiddaħhal bl-ilma, jew minhabba l-karatteristiċi fizikokimiċi (solubilità baxxa) jew id-disponibilità kimika limitata, jista' jiġi kkunsidrat li tiġi introdotta mal-ikel. Saret hidma preliminari fuq espożizzjonijiet djetetiċi; madankollu, din ir-rotta ta' espożizzjoni ma tintużax spiss. L-għażla tal-metodu għandha tiġi ddokumentata u vverifikata b'mod analitiku.

Għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

Stabbiliment tal-Konċentrazzjoni Għolja tat-Test

16. Għall-finijiet ta' dan it-test, il-konċentrazzjoni għolja tat-test għandha tiġi stabbilita permezz tal-limitu tas-solubilità tas-sustanza kimika tat-test; il-konċentrazzjoni massima ttollerata (MTC) għal sustanzi kimiċi b'tossiċità akuta; jew 100 mg/l, liema minnhom ikun l-inqas.

17. L-MTC hija ddefinita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li tirrizulta f'mortalità akuta ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li hemm dejta empirika eżistenti dwar il-mortalità akuta li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC jaf ma tkunx preċiża u normalment tehtieg ċertu ġudizzju professjonali. Għad li l-użu ta' mudelli ta' rigressjoni jista' jkun l-iktar approċċ teknikament validu sabiex tiġi stmata l-MTC, approssimazzjoni siewja tal-MTC tista' tinkiseb mid-dejta akuta eżistenti billi jintuża terz mill-valur tal-LC₅₀ akuta. Madankollu, id-dejta dwar it-tossiċità akuta tista' tkun nieqsa għall-ispeċijiet tat-test. Jekk ma jkunx hemm dejta dwar it-tossiċità akuta speċifika għall-ispeċi disponibbli, jista' jsir test tal-LC₅₀ fuq 96 siegħa b'imrieżeb li jirrappreżentaw (jiġifieri li huma fl-istess stadju) lil dawg tat-test fl-AMA. Jekk hemm dejta minn speċijiet akkwatiċi oħrajn disponibbli (eż. studji tal-LC₅₀ f'hut jew speċijiet amfibji oħrajn), huwa possibbli li jintuża ġudizzju professjonali sabiex tiġi stmata MTC probabbli fuq il-bażi ta' estrapolazzjoni bejn l-ispeċijiet.

18. Inkella, jekk is-sustanza kimika ma tkunx jkollhiex tossiċità akuta u tkun tinhall f'iktar minn 100 mg/l, f'dak il-każ il-100 mg/l għandha titqies l-ogħla konċentrazzjoni tat-test (HTC), peress li din il-konċentrazzjoni tipikament titqies "prattikament mhux tossika."

▼ **M6**

19. Għad li mhumiex il-proċedura rrakkomandata, jistgħu jintużaw metodi ta' tiġdid statiku meta l-metodu ta' fluss kontinwu ma jkunux adegwati biex jiksbu l-MTC. Jekk jintużaw metodi ta' tiġdid statiku, f'dak il-każ l-istabbiltà tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi ddokumentata u tibqa' fi hdan il-limiti tal-kriterji tal-prestazzjoni. Huma rrakkomandati perjodi ta' tiġdid kull erbgħa u għoxrin siegħa. Perjodi ta' tiġdid li jaqsbu t-72 siegħa mhumiex aċċettabbli. Barra minn hekk, il-parametri tal-kwalità tal-ilma (eż. id-DO, it-temperatura, il-pH, eċċ.) għandhom jittkelju fi tmiem kull perjodu ta' tiġdid, eżatt qabel it-tiġdid.

Medda tal-Konċentrazzjoni tat-Test

20. Hemm *minimu* mehtieg ta' tliet konċentrazzjonijiet tat-test u kontroll tal-ilma nadif (u kontroll tal-veikolu jekk hemm bżonn). Id-differenzjali minima tal-konċentrazzjoni tat-test bejn l-ogħla u l-inqas għandha tkun ta' madwar ordni ta' kobor wiehed. Is-separazzjoni tad-doża massima hija ta' 0,1 u l-minimu huwa 0,33.

PROCEDURA

Bidu u Twettiq tat-Test*Jum 0*

21. L-espożizzjoni għandha tinbeda meta jkun hemm numru biżżejjed ta' mrieżeb fil-popolazzjoni tal-istokk ta' qabel l-espożizzjoni li laħqu l-istadju 51 tal-iżvilupp, skont Nieuwkoop and Faber (8), u li għandhom eż ta' 17-il jum jew inqas wara l-fertilizzazzjoni. Għall-ghażla tal-annimali tat-test, imrieżeb b'saħħithom u normali mill-popolazzjoni tal-istokk għandhom jingabru f'reċipjent wiehed li fih volum xieraq ta' ilma ta' dilwizzjoni. Sabiex jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp, l-imrieżeb għandhom jitnehhew wiehed, wiehed mit-tank tar-raggruppament billi jintużaw xibka żgħira jew passatur u jiġu ttrasferiti f'kompartiment tal-kejl trasparenti (eż. dixx Petri ta' 100 mm) li fih ilma ta' dilwizzjoni. Sabiex jiġi stabbilit l-istadju, idealment ma tintużax anesteżija, iżda l-imrieżeb jistgħu jiġu anestetizzati wiehed, wiehed bl-użu ta' 100 mg/l trikaina metansulfonat (eż. MS-222), ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju (pH 7,0), qabel it-trasferiment. Jekk tintuża, il-metodoloġija għall-użu xieraq ta', eż., MS-222 għall-anesteżija għandha tinkiseb minghand laboratorji tal-esperjenza u tiġi rrapportata mar-riżultati tat-testijiet. L-annimali għandhom jitnehhew b'attenzjoni matul dan it-trasferiment sabiex jitnaqqas kemm jista' jkun l-istress tat-trasferiment u jiġi evitat milli jwegġgħu.
22. L-istadju tal-iżvilupp tal-annimali huwa stabbilit billi jintuża mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari. Biex titnaqqas il-varjabbiltà finali fl-istadju tal-iżvilupp, importanti li s-sejbien tal-istadju jsir bl-ikbar preċiżjoni possibbli. Skont Nieuwkoop and Faber (8), it-tragward primarju tal-iżvilupp għall-ghażla tal-organizmi fl-istadju 51 huwa l-morfoloġija tas-sieq ta' wara. Il-karatteristiċi morfoloġiċi tas-saqajn ta' wara għandhom jiġu mixtarra taht il-mikroskopju. Filwaqt li għandha tiġi kkonsultata l-gwida shiha ta' Nieuwkoop and Faber (8) għal informazzjoni komprensiva dwar is-sejbien tal-istadji tal-imrieżeb, l-istadju jista' jiġi stabbilit b'mod affidabbli billi jintużaw tragwardi morfoloġiċi prominenti. Tista' tintuża t-tabella li ġejja sabiex jiġi ssimplifikat u standardizzat il-proċess ta' sejbien tal-istadju matul l-istudju billi jiġu identifikati dawk it-tragwardi morfoloġiċi prominenti assoċjati ma' stadji differenti, jekk jiġi supponut żvilupp normali.

▼ M6

Tabella 2.

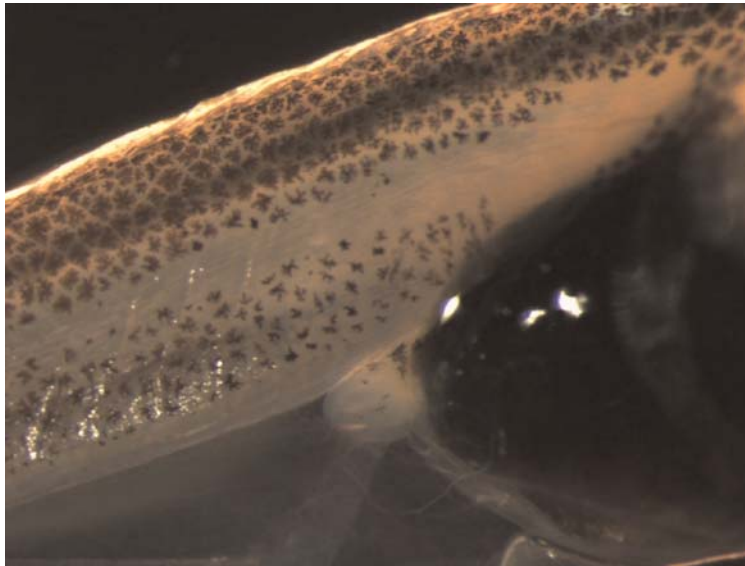
Tragwardi morfologiċi prominenti fis-sejbien tal-istadju fuq il-bażi tal-gwida ta' Nieuwkoop and Faber.

Tragwardi Morfoloġiċi Prominenti.	Stadju tal-Izvilupp															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Sieq ta' Wara	X	X	X	X	X	X	X									
Saqajn ta' Quddiem						X	X	X	X	X						
Struttura tal-kranju tal-wiċċ										X	X	X	X			
Morfologija tan-nerv olfattiv											X	X	X			
Tul tad-denb													X	X	X	X

23. X L-iktar tragward morfologiku prominenti fis-sejbien tal-istadju għal dak l-istadju huwa l-morfologija tas-sieq ta' wara, li jintwera fil-Figura 1.

Figura 1.

Il-morfologija tas-sieq ta' wara ta' marżebba X. laevis tal-istadju 51.



24. Minbarra l-għażla tal-istadju tal-izvilupp, tista' tintuza għażla fakultattiva tad-daqs tal-annimali sperimentali. Għal dan il-ghan, it-tul shih tal-gisem (mhux l-SVL) għandu jitkejjel fil-jum 0 għal subkampjun ta' madwar 20 marżebba tal-istadju 51 ta' NF. Wara li jiġi kkalkolat it-tul medju tal-gisem shih għal dan il-grupp ta' annimali, jistgħu jiġu stabbiliti l-limiti minimi u massimi għat-tul tal-gisem shih tal-annimali sperimentali f'medda tal-valur medju $\pm$ 3 mm (il-valuri medji tal-medda tat-tul tal-gisem shih bejn 24,0 u 28,1 mm għal imrieżeb tal-istadju 51). Madankollu, is-sejbien tal-istadju tal-izvilupp huwa l-parametru primarju sabiex jiġi stabbilit kemm huwa lest kull annimal tat-test. Imrieżeb li juru sfigurazzjonijiet jew korrimenti vizibbli mill-ewwel għandhom jiġu esklużi mill-assaġġ.

▼ **M6**

25. Imrieżeb li jissodisfaw il-kriterji tal-istadju deskritti hawn fuq jinżammu f'tank mimli ilma nadif tal-koltura sakemm jitlesta l-proċess tas-sejbien tal-istadju. Ladarba jitlesta s-sejbien tal-istadju, il-larva tiġi distribwita għal għarrieda għal tankijiet tat-trattament ta' espożizzjoni sakemm kull tank ikun fih 20 larva. Imbagħad, kull tank tat-trattament jiġi spezzjonat għal annimali b'dehra anormali (eż., korrimenti, imġiba anormali meta jgħumu, eċċ.). Imrieżeb li jidher biċ-ċar li ma jkunux b'saħħithom għandhom jitnehhew mit-tankijiet tat-trattament u jinbidlu ma' larva magħżula ġdida mit-tank tar-raggruppament.

Osservazzjonijiet

26. Għal iktar informazzjoni ddettaljata dwar il-proċeduri ta' tmiem it-test u l-ipproċessar tal-imrieżeb, irreferi għad-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Istologija tat-Tirojde tal-Amfibji (9).

Kejliet tal-Jum 7

27. Fil-jum 7, minn kull tank tat-test jitnehhew hames imrieżeb magħżulin għal għarrieda għal kull irreplikant. Il-proċedura għal għarrieda użata għandha tagħti lil kull organizzmu tat-test probabilità ndaqs li jingħazel. Dan jista' jinkiseb billi jintuza kwalunkwe metodu ta' għażla għal għarrieda iżda jehtieg li kull marżebba tinqabad bix-xibka. L-imrieżeb magħżulin jitregġgħu lura fit-tank ta' oriġini u l-imrieżeb magħżulin jiġu ewtanizzati b'mod dinjituż f'150 sa 200 mg/l, eż., MS-222, ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju sabiex tinkiseb pH 7,0. L-imrieżeb ewtanizzati jitlaħlhu fl-ilma u jitnixxfu b'taptip, u mbagħad jiġi stabbilit il-piż tal-ġisem tagħhom sal-eqreb milligramma. It-tul tas-sieq ta' wara, it-tul mill-imnieher sal-anus, u l-istadju tal-iżvilupp (bl-użu ta' mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari) jiġu stabbiliti għal kull marżebba.

Kejliet tal-Jum 21 (Tmiem it-Test)

28. Fi tmiem it-test (jum 21), l-imrieżeb li jifdal jitnehhew mit-tankijiet tat-test u jiġu ewtanizzati b'mod dinjituż f'150 sa 200 mg/l, eż. MS 222, ibbaferjata kif xieraq b'bikarbonat tas-sodju, kif spjegat iktar 'il fuq. L-imrieżeb jitlaħlhu fl-ilma u jitnixxfu b'taptip, u mbagħad jiġi stabbilit il-piż tal-ġisem tagħhom sal-eqreb milligramma. L-istadju tal-iżvilupp, l-SVL, u t-tul tas-sieq ta' wara jitkejlu għal kull marżebba.
29. Il-larva kollha titqiegħed f'fissattiv ta' Davidson għal 48 sa 72 siegħa jew bhala kampjuni tal-ġisem shih jew bhala kampjuni tat-tessut tar-ras maqtugħ li fihom ix-xedaq ta' isfel għal valutazzjonijiet istoloġiċi. Għal istopatoloġija, b'kollox għandhom jiġu kkampjunati hames imrieżeb minn kull tank irreplikant. Peress li l-gholi taċ-ċelloli tal-follikoli jiddependi mill-istadju (10), l-iktar approċċ xieraq tal-kampjunar għall-analiżijiet istoloġiċi huwa li jintużaw individwi mqabblin mal-istadju, kull meta dan ikun possibbli. Sabiex jintgħażlu individwi mqabblin mal-istadju, l-ewwel irid jinstab l-istadju tal-larva kollha qabel l-għażla u l-ipproċessar sussegwenti għall-preservazzjoni u l-gbir tad-dejta. Dan huwa neċessarju għaliex divergenza normali fl-iżvilupp tirriżulta f'distribuzzjonijiet differenzjali tal-istadji f'kull tank irreplikant.
30. L-annimali magħżulin għal istopatoloġija (n = 5 minn kull irreplikant) għandhom jitlaqqgħu mal-istadju medju tal-kontrolli (l-irreplikati raggruppati) kull meta dan ikun possibbli. Jekk hemm tankijiet irreplikati b'iktar minn hames larva fl-istadju xieraq, f'dak il-kaz il-hames larva jintgħażlu għal għarrieda.

▼ **M6**

31. Jekk hemm tankijiet irreplikati b'inqas minn hames larva fl-istadju xieraq, f'dak il-każ l-individwi magħżulin mill-istadju tal-iżvilupp superjuri jew inferjuri li jmiss għandhom jiġu kampjunati sabiex jintlaħaq daqs totali tal-kampjun ta' hames larva għal kull irreplikat. Idealment, id-deċiżjoni ta' kampjunar ta' larva addizzjonali mill-istadju tal-iżvilupp superjuri jew inferjuri li jmiss għandha tittiehed fuq il-bażi ta' evalwazzjoni ġenerali tad-distribuzzjoni tal-istadju fit-trattamenti ta' kontroll u kimiċi. Jiġifieri, jekk it-trattament kimiku jkun assoċjat ma' żvilupp tardiv, għandu mbagħad jittiehed kampjun ta' larva addizzjonali mill-istadju inferjuri li jmiss. Izda jekk it-trattament kimiku jkun assoċjat ma' żvilupp mgħaġġel, għandu jittiehed kampjun ta' larva addizzjonali mill-istadju superjuri li jmiss.
32. F'każijiet ta' alterazzjonijiet serji fl-iżvilupp tal-imrieżeb minhabba trattament b'sustanza kimika tat-test, ma jistax ikun hemm sovrappożizzjoni tad-distribuzzjoni tal-istadju fit-trattamenti kimiċi fuq l-istadju tal-iżvilupp medju ta' kontroll ikkalkolat. F'dawn il-każijiet biss, il-proċess tal-ghazla għandu jiġi mmodifikat billi jintuża stadju differenti mill-istadju medju ta' kontroll sabiex jinkiseb kampjunar imqabbel mal-istadju tal-larva għal istopatoloġija tat-tirojde. Barra minn hekk, jekk l-istadji huma indeterminati (jiġifieri asinkronija), f'dak il-każ għandhom jingħazlu 5 imrieżeb għal għarrieda minn kull irreplikat għal analiżi istoloġika. Għandha tiġi rrapportata r-raġuni għall-kampjunar ta' kwalunkwe larva li mhijiex fi stadju ekwivalenti għall-istadju tal-iżvilupp medju ta' kontroll.

Determinazzjoni tal-Punti ta' Tmiem Bijoloġiċi

33. Matul il-fażi ta' espożizzjoni tal-jum 21, il-kejl tal-punti ta' tmiem primarji jsir fil-jiem 7 u 21, madankollu hemm bżonn li l-annimali tat-test jiġu osservati kuljum. It-Tabella 3 tagħti harsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-kejl u l-punti ta' żmien tal-osservazzjoni korrispondenti. Hemm iktar informazzjoni ddettaljata dwar il-proċeduri tekniċi għall-kejl tal-punti ta' tmiem apikali u l-valutazzjonijiet istoloġiċi disponibbli fid-dokumenti ta' gwida tal-OECD (9).

Tabella 3.

Punti ta' żmien tal-osservazzjoni għal punti ta' tmiem primarji fl-AMA.

Punti ta' Tmiem Apikali	Kuljum	Jum 7	Jum 21
— Mortalità	•		
— Stadju tal-Iżvilupp		•	•
— Tul tas-Sieq ta' Wara		•	•
— Tul mill-Imnieher sal-Anus		•	•
— Piż tal-Ġisem Imxarrab		•	•
— Istoloġija tal-Glandola tat-Tirojde			•

▼ **M6****Punti ta' Tmiem Apikali**

34. L-istadju tal-iżvilupp, it-tul tas-sieq ta' wara, l-SVL u l-piż imxarrab huma l-punti ta' tmiem apikali tal-AMA, u kull wiehed minnhom huwa diskuss fil-qosor hawn taht. Hemm iktar informazzjoni teknika għall-ġbir ta' din id-dejta disponibbli fid-dokumenti ta' gwida referenzjali, inklużi proċeduri għal analiżi assistita bil-kompjuter li huma rrakkomandati għall-użu.

L-Istadju tal-Iżvilupp

35. L-istadju tal-iżvilupp ta' mrieżeb *X. laevis* jiġi stabbilit bl-użu tal-kriterji tas-sejbien tal-istadju ta' Nieuwkoop and Faber (8). Id-dejta dwar l-istadju tal-iżvilupp tintuża sabiex jiġi stabbilit jekk l-iżvilupp huwiex mgħaġġel, asinkroniku, tardiv jew mhux affettwat. Żvilupp mgħaġġel jew tardiv huwa stabbilit billi jsir paragun bejn l-istadju medju miksub mill-grupp ta' kontroll u dak ittrattat. Żvilupp asinkroniku huwa rrapportat meta t-tessuti eżaminati ma jkunux sfigurati jew anormali, iżda t-twaqqit relattiv tal-morfoġenesi jew l-iżvilupp ta' tessuti differenti jkun imfexxkel fi ħdan marżebba wahda.

It-Tul tas-Sieq ta' Wara

36. Differenzazzjoni u tkabbir tas-sieq ta' wara huma taht il-kontroll tal-ormoni tat-tirojde u huma traggwardi kbar tal-iżvilupp li diġà huma użati meta jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp. L-iżvilupp tas-sieq ta' wara jintuża b'mod kwalitattiv meta jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp, iżda hawnhekk jitqies bhala punt ta' tmiem kwantitattiv. Għaldaqstant, it-tul tas-sieq ta' wara jitkejjel bhala punt ta' tmiem sabiex jiġu identifikati l-effetti fuq l-assi tat-tirojde (Figura 2). Għal konsistenza, it-tul tas-sieq ta' wara jitkejjel fuq is-sieq xellugija ta' wara. It-tul tas-sieq ta' wara jiġi evalwat fil-jum 7 u fil-jum 21 tat-test. Fil-jum 7, il-kejl tas-sieq ta' wara huwa sempliċi, kif muri fil-Figura 2. Madankollu, il-kejl tat-tul tas-sieq ta' wara fil-jum 21 huwa iktar ikkumplikat minhabba liwġiet fis-sieq. Għaldaqstant, il-kejl tas-sieq ta' wara fil-jum 21 għandhom jibdew mir-rita ta' barra tal-ġisem u jsegwu l-linja medjana tas-sieq u jibqgħu għaddejjin minn kwalunkwe devjazzjoni fl-angoli. Bidliet fit-tul tas-sieq fil-jum 7, anki jekk ma jkunux evidenti fil-jum 21, xorta wahda jitqiesu sinifikanti għal attività potenzjali tat-tirojde. Il-kejl tat-tul jinkisbu minn ritratti diġitali bl-użu ta' software ta' analiżi tal-immaġnijiet kif spjegat fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Istoloġija tat-Tirojde tal-Amfibji (9).

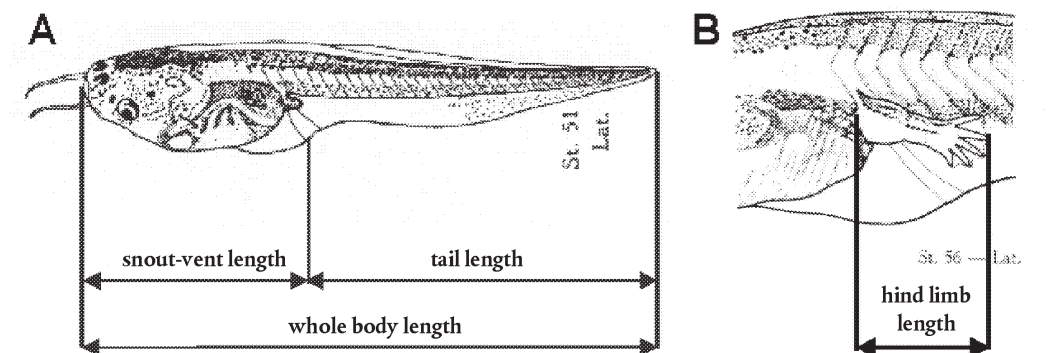
It-Tul tal-Ġisem u l-Piż Imxarrab

37. Il-kalkoli tat-tul mill-imnieher sal-anus (SVL) (Figura 2) u l-piż imxarrab huma inklużi fil-protokoll tat-test sabiex jiġu vvalutati l-effetti possibbli tas-sustanzi kimiċi tat-test fuq ir-rata tat-tkabbir tal-imrieżeb meta mqabblin mal-grupp ta' kontroll u huma siewja sabiex tinstab it-tossicità ġeneralizzata għas-sustanza kimika tat-test. Peress li t-tneħħija tal-ilma aderenti għall-kalkoli tal-piż tista' tikkaġuna kundizzjonijiet stressanti għall-imrieżeb u tista' tikkaġuna ħsara fuq il-ġilda, dawn il-kejl isiru fuq l-imrieżeb tas-subkampjun tal-jum 7 u l-imrieżeb kollha li jifdal fi tmiem it-test (jum 21). Għal konsistenza, uża l-aspett kranjali tal-anus bhala l-limitu inferjuri tal-kejl.
38. It-tul mill-imnieher sal-anus (SVL) jintuża biex jiġi vvalutat kemm kibret il-marżebba kif muri fil-Figura 2.

▼ M6

Figura 2.

(A) It-tipi ta' kejljet tat-tul tal-ġisem u (B) Il-kejljet tat-tul tas-sieq ta' wara għal imrieżeb *X. laevis* (1).



Istoloġija tal-Glandola tat-Tirojde

39. Filwaqt li l-istadju tal-iżvilupp u t-tul tas-sieq ta' wara huma punti ta' tmiem importanti biex jiġu evalwati bidliet marbutin mal-espożizzjoni fl-iżvilupp metamorfiku, żvilupp tardiv, minnu nnifsu, ma jistax jitqies bħala indikatur djanjostiku ta' attività antitirojde. Ċerti bidliet jistgħu jiġu osservati biss permezz ta' analiżi istopatoloġika ta' rutina. Il-kriterji djanjostiċi jinkludu ipertrofija/atrofija tal-glandola tat-tirojde, ipertrofija taċ-ċelloli follikolari, iperplażja taċ-ċelloli follikolari, u bħala kriterji kwalitattivi addizzjonali: zona tal-lumen follikolari, kwalità tal-kollojde u tul/forma taċ-ċelloli follikolari. Għandu jiġi rrapportat il-grad tas-severità (4 gradi). Informazzjoni dwar il-kisba u l-ipproċessar ta' kampjuni għal analiżi istoloġika u għat-tweġġ ta' analiżijiet istoloġiċi fuq kampjuni ta' tessuti hija disponibbli fl-"Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji: Parti 1 — Gwida teknika għall-kampjunar morfoloġiku u t-thejjija istoloġika" u "Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji: Parti 2 — Approċċ għall-qari ta' studji, kriterji djanjostiċi, klassifikazzjoni tas-severità u atlas" (9). Laboratorji li jagħmlu l-assaġġ għall-ewwel darba/drabi għandhom ifittxu pariri mingħand patoloġisti tal-esperjenza għal skopijiet ta' tahrig qabel ma jagħmlu analiżi istoloġika u evalwazzjoni tal-glandola tat-tirojde. Bidliet kbar u sinifikanti fil-punti ta' tmiem apikali li jindikaw żvilupp mghaġġel jew asinkronija jistgħu jipprekludu l-htieġa li ssir analiżi istopatoloġika tal-glandoli tat-tirojde. Madankollu, nuqqas ta' bidliet morfoloġiċi ċari jew evidenza ta' żvilupp tardiv huma motivi validi għal analiżijiet istoloġiċi.

Mortalità

40. It-tankijiet tat-test kollha għandhom jiġu vverifikati kuljum għal imrieżeb mejtin u n-numri jridu jiġu rreġistrati għal kull tank. Għandhom jitnizzlu d-data, il-koncentrazzjoni u n-numru tat-tank għal kwalunkwe osservazzjoni tal-mortalità. L-annimali mejtin għandhom jitnehhew mit-tank tat-test malli jiġu osservati. Rati tal-mortalità li jaqbu 1-10 % jistgħu jindikaw kundizzjonijiet tat-test mhux xierqa jew effetti tossiċi tas-sustanza kimika tat-test.

Osservazzjonijiet Addizzjonali

41. Każijiet ta' mġiba anormali u sfigurazzjonijiet u lezjonijiet li jidhru mill-ewwel għandhom jiġu rreġistrati. Id-data, il-koncentrazzjoni u n-numru tat-tank għandhom jiġu rreġistrati għal kwalunkwe osservazzjoni ta' mġiba

▼ M6

anormali, sfigurazzjonijiet jew leżjonijiet kbar. Imġiba normali hija kkaratterizzata minn imrieżeb sospiżi fil-kolonna tal-ilma bid-denb 'il fuq fuq ir-ras, taħbit ritmiku regolari tal-pinna tad-denb, tluġh perjodiku fil-wieċ, operkulazzjoni, u risponsività għall-istimoli. Imġiba anormali tinkludi, pereżempju, meta jibqgħu fil-wieċ, mimdudin f'qiegħ it-tank, jgħowmu b'lura jew b'mod irregolari, ma tantx ikunu attivi fil-wieċ, u ma tantx ikunu risponsivi għall-istimoli. Barra minn hekk, għandu jinżamm rekord tad-differenzi gross fil-konsum tal-ikel bejn it-trattamenti. Sfigurazzjonijiet u leżjonijiet kbar jistgħu jinkludi anormalitajiet morfoloġiċi (eż. deformitajiet tas-saqajn), leżjonijiet emorraġiċi, infezzjonijiet batterjali jew fungali, li huma biss ftit minnhom. Dawn il-kalkoli huma kwalitattivi u għandhom jitqiesu l-istess bħal sinjali kliniċi ta' mard/stress u jsiru f'paragun mal-annimali ta' kontroll. Jekk l-okkorrenza jew ir-rata ta' okkorrenza tkun ikbar fit-tankijiet esposti milli fil-kontrolli, f'dak il-każ dawn għandhom jitqiesu bħala evidenza għal tossiċità kbira.

DEJTA U RAPPORTAR

Ġbir ta' Dejta

42. Id-dejta kollha għandha tingabar bl-użu ta' sistemi elettronici jew manwali li jikkonformaw ma' prattiki tajbin tal-laboratorju (GLP). Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Is-sustanza kimika tat-test:

- Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: karatteristiċi fiżikoki-miċi; informazzjoni fuq l-istabbiltà u l-bijodegradabilità;
- Informazzjoni u dejta dwar is-sustanza kimika: metodu u frekwenza tal-preparazzjoni ta' dilwizzjonijiet. L-informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test tinkludi konċentrazzjonijiet propji u nominali tas-sustanza kimika tat-test, u f'xi każijiet, sustanza kimika mhux oriġinarja, kif xieraq. Il-kejl tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jkunu meħtieġa għal soluzzjonijiet ewlenin kif ukoll għal soluzzjonijiet tat-test;
- Solvent (jekk mhuwiex ilma): ġustifikazzjoni tal-ghażla tas-solvent, u karatterizzazzjoni tas-solvent (għamla, konċentrazzjoni użata);

Kundizzjonijiet tat-test:

- Rekords operazzjonali: dawn jikkonsistu f'osservazzjonijiet li jappartjenu għat-thaddim tas-sistema tat-test u l-ambjent u l-infrastruttura ta' sostenn. Ir-rekords tipiċi jinkludu: temperatura ambjentali, temperatura tat-test, fotoperjodu, status tal-komponenti kritiċi tas-sistema ta' espożizzjoni (eż. pompi, ċiklometri, pressjonijiet), rati tal-fluss, livelli tal-ilma, bidliet tal-flixkun tal-istokkijiet, u rekords dwar it-tmiġ. Il-parametri ġenerali tal-kwalità tal-ilma jinkludu: pH, DO, kondottività, jodju totali, alkalinità u l-ebusija;
- Devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar: din l-informazzjoni għandha tinkludi kwalunkwe informazzjoni jew deskrizzjoni narrattiva ta' devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar;

Riżultati:

- Osservazzjonijiet u dejta bijoloġiċi: dawn jinkludu osservazzjonijiet ta' kuljum tal-mortalità, konsum ta' ikel, imġiba anormali tal-ghawm, letargija, telf ta' ekwilibriju, sfigurazzjonijiet, leżjonijiet, eċċ. Osservazzjonijiet u dejta miġburin f'intervalli prestabbiliti jinkludu: stadju tal-iżvilupp, tul tas-sieq ta' wara, tul mill-innieher sal-anus, u l-piż imxarrab;

▼ **M6**

- Tekniki analitiċi statistiċi u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati; riżultati tal-analiżi statistika, idealment f'forma ta' tabella;
- Dejta istoloġika: dawn jinkludu deskrizzjonijiet narrattivi, kif ukoll il-punteġġi tas-severità u l-inċidenza kklassifikati tal-osservazzjonijiet speċifiċi, kif spjegati fid-dokument ta' gwida dwar l-istopatoloġija;
- Osservazzjonijiet ad hoc: dawn l-osservazzjonijiet għandhom jinkludu deskrizzjonijiet narrattivi tal-istudju li ma joqogħdux fil-kategoriji deskritti qabel.

Rapportar tad-dejta

43. L-Appendiċi 2 fih spreadsheets tal-ġbir ta' dejta ta' kuljum li jistgħu jintużaw bħala gwida għat-tidhli tad-dejta mhux ipproċessata u għall-kalkoli ta' statistiki sommarji. Barra minn hekk, huma pprovduti tabelli tar-rapportar li huma konvenjenti għall-komunikazzjoni ta' sommarji ta' dejta dwar il-punti ta' tmiem. It-tabelli ta' rapportar għal valutazzjonijiet istoloġiċi jistgħu jinstabu fl-Appendiċi 2.

Kriterji tal-Prestazzjoni u Aċċettabilità/Validità tat-Test

44. Ġeneralment, devjazzjonijiet kbar mill-metodu ta' ttestjar ser iwasslu għal dejta mhux aċċettabbli għall-interpretazzjoni jew ir-rapportar. Għaldaqstant, il-kriterji li ġejjin fit-Tabella 4 ġew żviluppati bħala gwida sabiex tiġi stabbilita l-kwalità tat-test imwettaq, il-prestazzjoni ġenerali tal-organiżmi ta' kontroll.

Tabella 4.

Il-kriterji ta' prestazzjoni għall-AMA.

Kriterju	Limiti aċċettabbli
Konċentrazzjonijiet tat-test	Miżmuma $f \leq 20\%$ CV(varjabbiltà tal-konċentrazzjoni tat-test imkejla) tul it-test ta' 21 jum
Mortalità fil-kontrolli	$\leq 10\%$ — il-mortalità fi kwalukwe rreplikati minnhom fil-kontrolli ma għandhiex taqbeż iż-2 imrieżeb
L-istadju tal-iżvilupp medju minimu tal-kontrolli fi tmiem it-test	57
Il-firxa tal-istadju tal-iżvilupp fil-grupp ta' kontroll	L-10 u d-90 perċentil tad-distribuzzjoni tal-istadju tal-iżvilupp ma għandhomx iwarjaw b'iktar minn 4 stadji
Ossigenu Dissolt	$\geq 40\%$ saturazzjoni tal-arja (*)
pH	il-pH għandha tinzamm bejn 6,5-8,5. Id-differenzjali irreplikati/intertrattament ma għandhiex taqbeż iż-0,5.
Temperatura tal-ilma	$22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ — id-differenzjali irreplikati/intertrattament ma għandhiex taqbeż iż-0,5 °C
Konċentrazzjonijiet tat-test minghajr tossiċità ċara	≥ 2
Prestazzjoni tal-irreplikati	≤ 2 irreplikati fit-test jistgħu jkunu friskju

▼ **M6**

Kriterju	Limiti aċċettabbli
Kundizzjonijiet speċjali għall-użu ta' solvent	Jekk jintuża solvent trasportatur, għandu jintuża kemm kontroll tas-solvent kif ukoll kontroll tal-ilma nadif u r-riżultati għandhom jiġu rrapportati
	Differenzi statistikament importanti bejn il-kontroll tas-solvent u l-gruppi ta' kontroll tal-ilma huma ttrattati b'mod separat. Ara iktar 'il quddiem għal iktar informazzjoni
Kundizzjonijiet speċjali għas-sistema ta' tiġdid statiku	Għandhom jiġu rrapportati l-analizijiet tas-sustanzi kimiċi rappreżentattivi qabel u wara t-tiġdid
	Il-livelli tal-ammonijaka għandhom jitkejlu eżatt qabel it-tiġdid
	Il-parametri kollha tal-kwalità tal-ilma elenkati fit-Tabella 1 tal-Appendiċi 1 għandhom jitkejlu eżatt qabel it-tiġdid
	Il-perjodu ta' tiġdid ma għandux jaqbeż it-72 siegħa
	L-iskeda xierqa tat-tmiġ (50 % tal-proporzjon tal-ikel ta' kuljum tal-ghalf kummerċjali tal-imrieżeb) (*)

(*) L-ossigenazzjoni tal-ilma tista' tinkiseb b'apparati baqbieqa. Huwa rrakkomandat li l-apparati baqbieqa jiġu stabbiliti f'livelli li ma johlqux stress żejjed għall-imrieżeb.

Validità tat-Test

45. Ir-rekwiżiti li ġejjin għandhom jiġu ssodisfati sabiex test jitqies aċċettabbli/validu:

Esperiment validu f'test stabbilit bħala negattiv għall-attività tat-tirojde:

- (1) Għal kwalunkwe trattament partikolari (inkluzi kontrolli), il-mortalità ma tistax taqbeż l-10 %. Għal kwalunkwe rreplikati partikolari, il-mortalità ma tistax taqbeż it-tliet imrieżeb, inkella l-irreplikati jitqies li huwa friskju
- (2) Tal-inqas żewġ livelli tat-trattament, bl-erba' rreplikati mhux friskju kollha, għandhom ikunu disponibbli għal analiżi
- (3) Tal-inqas żewġ livelli mingħajr tossiċità kbira għandhom ikunu disponibbli għal analiżi

Esperiment validu f'test stabbilit bħala pożittiv għal attività tat-tirojde:

- (1) Il-mortalità ta' mhux iktar minn żewġ imrieżeb/irreplikati fil-grupp ta' kontroll tista' ssehh

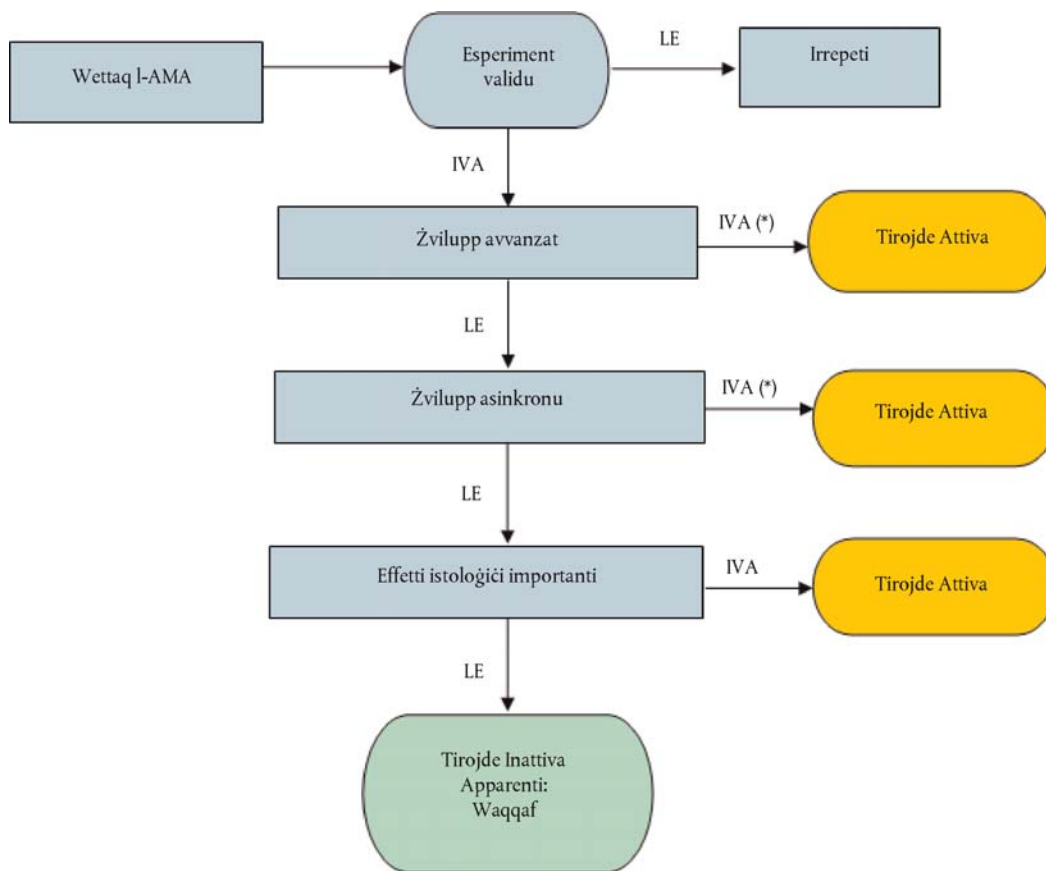
Loġika wara d-deċiżjoni għat-twettiq tal-AMA

46. Il-loġika wara d-deċiżjoni giet żviluppata għall-AMA sabiex tingħata assis-tenza loġika fit-twettiq u l-interpretazzjoni tar-riżultati tal-bijoassaggi (ara l-flowchart fil-Figura 3). Essenzjalment, il-loġika wara d-deċiżjoni tixtarr il-punti ta' tmiem f'dak l-iżvilupp avvanzat, l-iżvilupp asinkroniku u l-isto-patoloġija tat-tirojde jingħataw ponderazzjoni importanti, filwaqt li l-iżvi-lupp tardiv, it-tul mill-imnieher sal-anus u l-piż tal-ġisem imxarrab, para-metri li għandhom il-potenzjal li jkunu affettwati mit-tossiċità ġenerali, jingħataw ponderazzjoni inqas importanti.

▼ **M6**

Figura 3.

Il-loġika wara d-deċiżjoni għat-twertiq tal-AMA.



(*) L-istoloġija tista' tkun meħtieġa minn ċerti awtoritajiet regolatorji minkejja differenzi importanti fl-iżvilupp avanzat u asinkronu. L-entità li tagħmel dan it-test hija meħtieġa tikkonsulta lill-awtoritajiet meħtieġa qabel tagħmel it-test sabiex tistabbilixxi liema punti ta' tmiem huma meħtieġa.

Żvilupp avanzat (stabbilit bl-użu tal-istadju tal-iżvilupp, l-SVL u l-HLL)

47. L-iżvilupp avanzat huwa magħruf li jsehh biss bl-effetti li huma relatati mal-ormon tat-tirojde. Dawn jistghu jkunu effetti tat-tessut periferali bħal interazzjoni diretta mar-riċettur tal-ormon tat-tirojde (bħal bit-T4) jew effetti li jibdlu l-livelli tal-ormon tat-tirojde ċirkolanti. Ikun xi jkun il-każ, dan jitqies bħala prova biżżejjed li tindika li s-sustanza kimika għandha attività fit-tirojde. L-iżvilupp avanzat huwa evalwat b'mod wiehed minn tnejn. L-ewwel, l-istadju tal-iżvilupp ġenerali jista' jiġi evalwat billi jintuza l-approċċ standardizzat spjegat f'Nieuwkoop and Faber (8). It-tieni, karatteristiċi morfoloġiċi speċifiċi jistghu jiġu kkwantifikati, bħat-tul tas-sieq ta' wara, fil-jum 7 u 21, li għandu assoċjazzjoni pożittiva mal-effetti agonistiċi fuq ir-riċettur tal-ormon tat-tirojde. Jekk isiru avvanzi statistikament sinifikanti fl-iżvilupp jew fit-tul tas-sieq ta' wara, f'dak il-każ it-test jindika li s-sustanza kimika hija attiva fit-tirojde.

▼ M6

48. L-evalwazzjoni tal-annimali tat-test għall-preżenza ta' żvilupp mgħaġġel b'rabta mal-popolazzjoni ta' kontroll ser tkun imsejsa fuq ir-riżultati ta' analiżijiet statistiċi mwettqin għall-erba' punti ta' tmiem li ġejjin:

— it-tul tas-sieq ta' wara (normalizzat mill-SVL) fil-jum 7 tal-istudju

— it-tul tas-sieq ta' wara (normalizzat mill-SVL) fil-jum 21 tal-istudju

— l-istadju tal-iżvilupp fil-jum 7 tal-istudju

— l-istadju tal-iżvilupp fil-jum 21 tal-istudju

49. L-analiżijiet statistiċi tat-tul tas-sieq ta' wara għandhom isiru fuq il-bażi tal-kejl tat-tul tas-sieq xellugija ta' wara. It-tul tas-sieq ta' wara huwa normalizzat billi jittiehed il-proporzjon tat-tul tas-sieq ta' wara għat-tul mill-imnieher għall-anus ta' individwu. Imbagħad titqabbel il-medja tal-valuri normalizzati għal kull livell tat-trattament. Imbagħad, l-aċċelerazzjoni tal-iżvilupp tiġi indikata minn żieda importanti fit-tul medju tas-sieq ta' wara (normalizzat) fi grupp tat-trattament bis-sustanza kimika meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll fil-jum 7 tal-istudju u/jew fil-jum 21 tal-istudju (ara l-Appendiċi 3).

50. L-analiżijiet statistiċi tal-istadju tal-iżvilupp għandhom isiru fuq il-bażi tal-istabbiliment tal-istadji tal-iżvilupp skont il-kriterji morfologiċi deskritti minn Nieuwkoop and Faber (8). Żvilupp mgħaġġel huwa indikat meta l-analiżi multikwantali ssib żieda importanti fil-valuri tal-istadju tal-iżvilupp fi grupp tat-trattament bis-sustanza kimika meta mqabbel mal-grupp ta' kontroll fil-jum 7 tal-istudju u/jew fil-jum 21 tal-istudju.

51. Fil-metodu ta' ttestjar tal-AMA, effett importanti fuq kwalunkwe wiehed mill-erba' punti ta' tmiem imsemmijin hawn fuq jitqies biżżejjed għal identifikazzjoni pożittiva ta' żvilupp mgħaġġel. Jiġifieri, effetti importanti fuq it-tul tas-sieq ta' wara f'punt ta' żmien speċifiku ma jehtigux li jiġu korroborati minn effetti importanti fuq it-tul tas-sieq ta' wara f'punt ta' żmien ieħor u lanqas minn effetti importanti fuq l-istadju tal-iżvilupp f'dan il-punt ta' żmien speċifiku. Min-naha tagħhom, effetti importanti fuq l-istadju tal-iżvilupp f'punt ta' żmien speċifiku ma jehtigux li jiġu korroborati minn effetti importanti fl-istadju tal-iżvilupp f'punt ta' żmien ieħor u lanqas minn effetti importanti fuq it-tul tas-sieq f'dan il-punt ta' żmien speċifiku. Il-piż tal-evidenza għall-iżvilupp mgħaġġel xorta waħda ser jidded jekk jinstabu effetti importanti għal iktar minn punt ta' tmiem wiehed.

Żvilupp asinkroniku (stabbilit bl-użu ta' kriterji tal-istadju tal-iżvilupp)

52. L-iżvilupp asinkroniku huwa kkaratterizzat minn tfixkil tat-twaqqit relattiv tal-morfoġenisi jew l-iżvilupp ta' tessuti differenti fi hdan marzebba individwali. In-nuqqas ta' hila li jiġi stabbilit l-istadju tal-iżvilupp ta' organiżmu bl-użu tal-firxa ta' punti ta' tmiem morfologiċi meqjusin tipiċi ta' kwalunkwe stadju partikolari jindika li t-tessuti qed jiżviluppaw b'mod asinkroniku bil-metamorfożi. L-iżvilupp asinkroniku huwa indikatur ta' attività fit-tirojde. L-uċi modalitajiet magħrufin ta' azzjoni li jikkawunaw żvilupp asinkroniku huma permezz tal-effetti ta' sustanzi kimiċi fuq azzjoni tal-ormon tat-tirojde periferali u/jew metabolizmu tal-ormon tat-tirojde fl-iżvilupp ta' tessuti kif inhu osservat b'inibituri tad-dejodinażi.

▼ M6

53. L-evalwazzjoni tal-annimali tat-test għall-preżenza ta' żvilupp asinkroniku relatat mal-popolazzjoni tal-kontroll ser tkun ibbażata fuq valutazzjoni morfoloġika gross tal-annimali tat-test fil-jum 7 tal-istudju u fil-jum 21 tal-istudju.
54. Id-deskrizzjoni tal-iżvilupp normali tal-*Xenopus laevis* minn Nieuwkoop and Faber (8) tippovdi l-qafas għall-identifikazzjoni ta' ordni sekwenzjali tar-rimodellar tat-tessut normali. It-terminu “żvilupp asinkroniku” jirreferi b'mod speċifiku għal dawk id-devjazzjonijiet fl-iżvilupp morfoloġiku gross tal-imrieżeb li ma jippermettux li jiġi stabbilit b'mod definittiv stadju tal-iżvilupp skont il-kriterji ta' Nieuwkoop and Faber (8) għaliex trawwardi morfoloġiċi importanti juru karatteristiċi ta' stadji differenti.
55. Kif jimplika t-terminu “żvilupp asinkroniku”, huma biss każijiet li juru devjazzjonijiet fil-progress ta' mmudellar mill-ġdid tat-tessuti speċifiċi relatati mal-progress tal-immudellar mill-ġdid ta' tessuti oħrajn li għandhom jiġu kkunsidrati. Ċerti fenotipi klassiċi jinkludu dewmien jew nuqqas ta' emerġenza tas-saqajn ta' wara minkejja żvilupp normali jew avvanzat tas-saqajn ta' wara u t-tessuti tad-denb, jew ir-risorbiment prekoċi tal-gargi b'rabta mal-istadju tal-morfoġenesi tas-saqajn ta' wara u r-risorbiment tad-denb. Annimal ser jiġi rreġistrat li qed juri żvilupp asinkroniku jekk ma jkunx jista' jiġi assenjat fi stadju għaliex jonqos milli jissodisfa l-maġġor parti tal-kriterji tal-iżvilupp trawward għal stadju partikolari ta' Nieuwkoop and Faber (8), jew jekk ikun hemm ittardjar jew aċċelerazzjoni estremi ta' karatteristika importanti wahda jew iktar (eż. risorbiment shih tad-denb, iżda s-saqajn ta' quddiem ma jkunux feġġew). Din il-valutazzjoni ssir b'mod kwalitattiv u għandha teżamina l-firxa shiha ta' karatteristiċi trawward elenkati minn Nieuwkoop and Faber (8). Madankollu, ma hemmx bżonn li jiġi rreġistrat l-istat tal-iżvilupp tad-diversi karatteristiċi trawward tal-annimali osservati. Annimali rreġistrati li juru żvilupp asinkroniku mhumix assenjati stadju tal-iżvilupp ta' Nieuwkoop and Faber (8).
56. B'hekk, kriterju ċentrali għad-deżinjazzjoni ta' każijiet ta' żvilupp morfoloġiku anormali bħala “żvilupp asinkroniku” huwa li t-twaqqit relattiv tal-immudellar mill-ġdid tat-tessuti u l-morfoġenesi tat-tessut huwa mxekkel filwaqt li l-morfoloġija tat-tessuti affettwati mhijiex anormali biċ-ċar. Eżempju li juri din l-interpretazzjoni ta' anomalitajiet morfoloġiċi gross huwa li l-morfoġenesi ttardjata tas-saqajn ta' wara b'rabta mal-iżvilupp ta' tessuti oħrajn ser tissodisfa l-kriterju ta' “żvilupp asinkroniku” filwaqt li każijiet li juru saqajn ta' wara niqsin, swaba' anormali (eż. ettrodattilja, polidattilja), jew sfigurazzjonijiet ċari oħrajn tas-saqajn ma għandhomx jitqiesu bħala “żvilupp asinkroniku”.
57. F'dan il-kuntest, it-trawwardi morfoloġiċi l-kbar li għandhom jiġu evalwati għall-progress metamorfiku koordinat tagħhom għandhom jinkludu morfoġenesi tas-saqajn ta' wara, morfoġenesi tas-saqajn ta' quddiem, feġġa tas-saqajn ta' quddiem, l-istadju tar-risorbiment tad-denb (b'mod partikolari r-risorbiment tal-pinna tad-denb), u l-morfoloġija tar-ras (eż. daqs tal-gargi u daqs tar-risorbiment tal-gargi, morfoloġija tax-xedaq ta' taht, protruzzjoni tal-qarquċa ta' Mechel).
58. Skont il-modalità tal-azzjoni tas-sustanza kiika, jistgħu jsejnhu fenotipi morfoloġiċi gross differenti. Ċerti fenotipi klassiċi jinkludu ttardjar jew nuqqas ta' feġġa tas-saqajn ta' quddiem minkejja żvilupp normali jew avvanzat tas-saqajn ta' wara u t-tessuti tad-denb, risorbiment prekoċi tal-gargi b'rabta mal-immudellar mill-ġdid tas-saqajn ta' wara u tad-denb.

▼ M6

Istopatoloġija

59. Jekk is-sustanza kimika ma tikkagunax tossiċità importanti u ma tħaffifx l-iżvilupp jew tikkaguna żvilupp asinkroniku, f'dak il-każ l-istopatoloġija tal-glandoli tat-tirojde tiġi evalwata bl-użu tad-dokument ta' gwida xieraq (9). L-ittardjar tal-iżvilupp, fin-nuqqas ta' tossiċità, huwa indikatur b'saħħtu ta' attività antitirojde, iżda l-analiżi tal-istadju tal-iżvilupp hija inqas sensittiva u inqas djanjostika mill-analiżi istopatoloġika tal-glandola tat-tirojde. Għalhekk, f'dan il-każ huwa mehtieg li jsiru analizijiet istopatoloġiċi tal-glandoli tat-tirojde. L-effetti fuq l-istoloġija tal-glandola tat-tirojde ntwerew fin-nuqqas ta' effetti tal-iżvilupp. Jekk isehhu bidliet fl-istopatoloġija tat-tirojde, is-sustanza kimika titqies li hija attiva fit-tirojde. Jekk ma jkun osservat ebda ttardjar fl-iżvilupp jew leżjonijiet istoloġiċi fil-glandoli tat-tirojde, is-sustanza kimika titqies li hija inattiva fit-tirojde. Il-ħsieb wara din id-deċiżjoni huwa li l-glandola tat-tirojde hija taħt l-influenza tat-TSH u kwalunkwe sustanza kimika li tibdel l-ormon tat-tirojde ċirkolanti biżżejjed tant li tinbidel is-sekrezzjoni tat-TSH ser tirriżulta f'bidliet istopatoloġiċi fil-glandoli tat-tirojde. Diversi modalitajiet u mekkaniżmi ta' azzjoni jistgħu jibdlu l-ormon tat-tirojde ċirkolanti. B'hekk, filwaqt li l-livell tal-ormon tat-tirojde jindika effett marbut mat-tirojde, dan mhuwiex biżżejjed sabiex jiġi stabbilit liema modalità jew mekkaniżmu ta' azzjoni huma marbutin mar-rispons.
60. Peress li dan il-punt ta' tmiem mhuwiex attribwibbli għal approċċi statistiċi bażiċi, opinjoni esperta ta' patologist għandha tistabbilixxi effett marbut mal-espożizzjoni għal sustanza kimika.

Żvilupp tardiv (stabbilit bl-użu tal-istadju tal-iżvilupp, HLL, BW, SVL)

61. Żvilupp tardiv jista' jsehh permezz ta' mekkaniżmi antitirojde u permezz ta' tossiċità indiretta. Ittardjar hafif fl-iżvilupp flimkien ma' sinjali ċari ta' tossiċità aktarx li jindikaw effett tossiku mhux speċifiku. Evalwazzjoni tat-tossiċità mhux tat-tirojde hija element essenzjali tat-test biex titnaqqas il-probabilità ta' riżultati ta' pożittiv falz. Mortaliżà eċċessiva hija indikazzjoni ovvja li qed isehhu mekkaniżmi tossiċi oħrajn. B'mod simili, tnaqqisiet ħfief fit-tkabbir, kif stabbiliti mill-piż imxarrab u/jew it-tul tal-SVL, jissuggerixxu tossiċità mhux tat-tirojde wkoll. Zidiet apparenti fit-tkabbir huma osservati spiss b'sustanzi kimiċi li jaffettwaw l-iżvilupp normali b'mod negattiv. Konsegwentement, il-preżenza ta' animali kbar mhux bilfors li tindika tossiċità mhux tat-tirojde. Madankollu, it-tkabbir qatt ma għandu jkun l-unika bażi sabiex tiġi stabbilita t-tossiċità tat-tirojde. Minflok għandhom jintużaw it-tkabbir flimkien mal-istadju tal-iżvilupp u l-istopatoloġija tat-tirojde sabiex tiġi stabbilita l-attività tat-tirojde. Punti ta' tmiem oħrajn għandhom jiġu kkunsidrati wkoll meta tiġi stabbilita tossiċità ċara inkluzi edema, leżjonijiet emorraġiċi, letarġija, konsum inqas ta' ikel, imġiba tal-ghawm stramba/mibdula, eċċ. Jekk il-konċentrazzjonijiet kollha tat-test juru sinjali ta' tossiċità ċara, is-sustanza kimika tat-test għandha terġa' tiġi evalwata f'konċentrazzjonijiet inqas tat-test qabel jiġi stabbilit jekk is-sustanza kimika hijiex potenzjalment attiva jew inattiva fit-tirojde.
62. Ittardjar statistikament importanti fl-iżvilupp, fin-nuqqas ta' sinjali oħrajn ta' tossiċità ċara, jindika li s-sustanza kimika hija attiva fit-tirojde (antagonistika). Fin-nuqqas ta' risponsi statistiċi kbar, dan l-eżitu jista' jissahħah b'riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde.

▼ **M6****Analizijiet statistiċi**

63. Idealment, l-analizijiet statistiċi tad-dejta għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument Approċċi Attwali fl-Analizi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotossicità: Gwida għall-Applikazzjoni (11). Għall-punti ta' tmiem kwantitattivi kontinwi kollha (HLL, SVL, piż imxarrab) konsistenti ma' doża-rispons monotoni, għandu jiġi applikat it-test rigressiv ta' Jonckheere-Terpstra sabiex jiġi stabbilit l-effett tat-trattament importanti.

64. Għal punti ta' tmiem kontinwi li mhumiex konsistenti ma' doża-rispons monotoni, id-dejta għandha tiġi vvalutata għan-normalità (idealment billi jintuza t-test ta' Shapiro-Wilk jew Anderson-Darling) u omoġenità tal-varjanza (idealment bl-użu tat-test ta' Levene). Iz-żewġ testijiet isiru fuq ir-residwi minn ANOVA. Jista' jintuza ġudizzju espert minflok dawn it-testijiet formali għan-normalità u l-omoġenità tal-varjanza, għad li t-testijiet formali huma ppreferuti. Meta tinstab nonnormalità jew eteroġenità tal-varjanza, għandha titfittex trasformazzjoni normalizzanti li tistabbilizza l-varjanza. Jekk id-dejta (forsi wara trasformazzjoni) normalment tiġi distribwita b'varjanza omoġena, it-test ta' Dunnett jistabbilixxi l-effett tat-trattament sinifikanti. Jekk id-dejta (forsi wara trasformazzjoni) normalment tiġi distribwita b'varjanza eteroġena, it-test ta' Tamhane-Dunnett jew T3 jew it-test-U ta' Mann-Whitney-Wilcoxon jistabbilixxi l-effett tat-trattament sinifikanti. Meta ma tkun tista' tinstab ebda trasformazzjoni normalizzanti, l-effett tat-trattament jiġi stabbilit mit-test-U ta' Mann-Whitney-Wilcoxon bl-użu ta' aġġustament ta' Bonferroni-Holm għall-valuri-p. It-test ta' Dunnett huwa applikat b'mod indipendenti minn kwalunkwe test-F ANOVA u t-test ta' Mann-Whitney huwa applikat b'mod indipendenti minn kwalunkwe test ġenerali ta' Kruskal-Wallis.

65. Mortalità sinifikanti mhijiex mistennija iżda għandha tiġi vvalutata mit-test rigressiv ta' Cochran-Armitage li fih id-dejta hija konsistenti mal-monotonicità tad-doża-rispons, u nkella mit-test Eżatt ta' Fisher b'aġġustament Bonferroni-Holm.

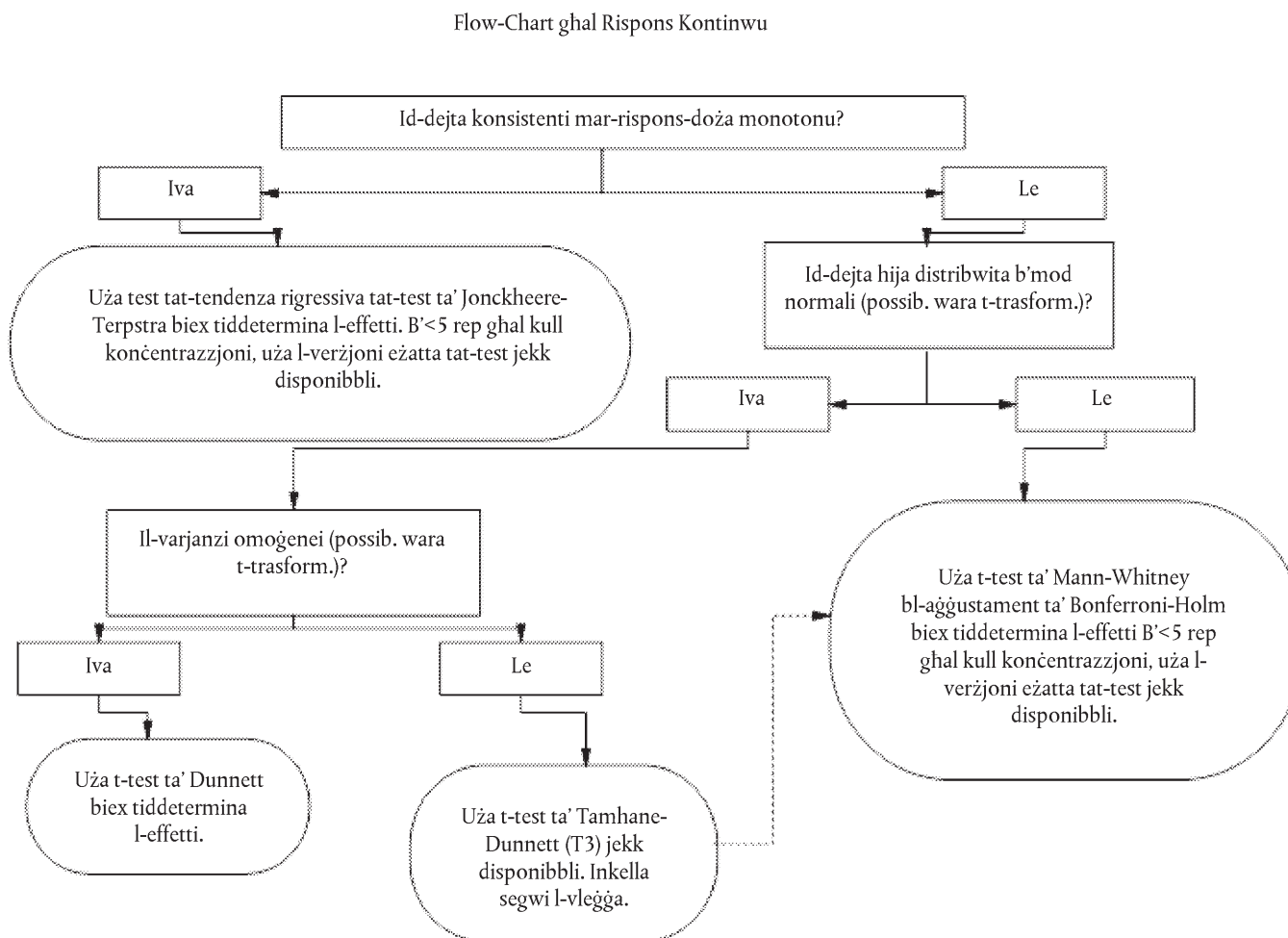
66. Effetti importanti tat-trattament għal stadju tal-iżvilupp huwa stabbilit mill-applikazzjoni rigressiva tat-test ta' Jonckheere-Terpstra applikat għall-medji tal-irreplikati. Inkella, u idealment, għandu jintuza t-test multikwantali ta' Jonckheere mill-20 sat-80 perċentil sabiex jiġi stabbilit l-effett, peress li jiehu f'kunsiderazzjoni bidliet fil-profil tad-distribuzzjoni.

67. L-unità xierqa ta' analizi hija l-irreplikati sabiex id-dejta tkun tikkonsisti f'medjani tal-irreplikati jekk jintuza t-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test-U ta' Mann-Whitney, jew il-medji tal-irreplikati jekk jintuza t-test ta' Dunnett. Il-monotonicità tad-doża-rispons tista' tiġi vvalutata vizwalment mill-medji jew il-medjani tal-irreplikati u t-trattament jew minn testijiet formali bħal dawk deskritti qabel (11). Bi ftit inqas minn hames irreplikati għal kull trattament jew kontroll, għandhom jintużaw il-verżjonijiet ta' permutazzjoni eżatti tat-testijiet ta' Jonckheere-Terpstra u Mann-Whitney jekk disponibbli. L-importanza statistika tat-testijiet kollha indikati hija ġġudikata fil-livell ta' sinifikanza 0,05.

68. Il-Figura 4 hija flow-chart għat-twettiq ta' testijiet statistiċi fuq dejta kontinwa.

Figura 4.

Flow-chart għal approċċi statistiċi għal dejta dwar ir-rispons kontinwu.



▼ **M6****Kunsiderazzjonijiet speċjali għall-analiżi tad-dejta***Użu ta' livelli tat-trattament f'riskju*

69. Jiġu kkunsidrati bosta fatturi meta jiġi stabbilit jekk irreplikati jew trattamenti shiħ jurix tossiċità ċara u għandux jitneħħa mill-analiżi. Tossiċità ċara hija ddefinita bħala > 2 mortalitajiet fi kwalunkwe rreplikati li jistgħu jiġu spjegati biss b'tossiċità u mhux żball tekniku. Sinjali oħrajn ta' tossiċità ċara jinkludu emorragija, imġiba anormali, xejriet tal-ghawn anormali, anoressija u kwalunkwe sinjal kliniku iehor ta' mard. Għal sinjali subletali ta' tossiċità, jista' jkun hemm bżonn ta' evalwazzjonijiet kwalitattivi, u dejjem għandha ssir referenza għall-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif.

Kontrolli tas-solvent

70. L-użu ta' solvent għandu jiġi kkunsidrat biss bħala l-aħħar rikors, wara li jkunew ġew ikkunsidrati l-għażliet kollha l-oħrajn ta' twassil. Jekk jintuża solvent, f'dak il-każ għandu jsir fl-istess hin kontroll b'ilma nadif. Fi tmiem it-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent. Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll tas-solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif. L-iktar punti ta' tmiem rilevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma l-istadju tal-iżvilupp, l-SVL u l-piż imxarrab, peress li dawn jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet mhux tiroj-dali. Jekk jinstabu differenzi statistikament importanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-grupp ta' kontroll bl-ilma nadif u dak ta' kontroll bis-solvent, sib il-punti ta' tmiem tal-istudju għall-miżuri tar-rispons bl-użu tal-kontroll bl-ilma nadif. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament importanti bejn il-kontroll bl-ilma nadif u l-kontroll bis-solvent għall-varjabbli tar-rispons kollha mkejlin, stabbilixxi l-punti ta' tmiem tal-istudju għall-miżuri tar-rispons bl-użu tal-kontrolli bl-ilma ta' dilwizzjoni u bis-solvent raggruppati.

Gruppi tat-trattament li jilhqgħu l-istadju 60 u iktar tal-iżvilupp

71. Wara l-istadju 60, l-imrieżeb juru tnaqqis fid-daqs u l-piż minhabba risorbiment tat-tessut u tnaqqis tal-kontenut tal-ilma assolut. B'hekk, il-kejl tal-piż imxarrab u l-SVL ma jistgħux jintużaw kif xieraq fl-analiżijiet statistiċi għal differenzi fir-rati ta' tkabbir. Għaldaqstant, il-piż imxarrab u d-dejta dwar it-tul mill-organizmi $> NF60$ għandhom jiġu ċensurati u ma jistgħux jintużaw fl-analiżijiet tal-medji tal-irreplikati jew il-medjani tal-irreplikati. Jistgħu jintużaw żewġ approċċi differenti sabiex jiġu analizzati dawn il-parametri relatati mat-tkabbir.
72. Approċċ minnhom huwa li jiġu kkunsidrati biss imrieżeb fl-istadju 60 tal-iżvilupp jew inqas għall-analiżijiet statistiċi tal-piż imxarrab u/jew l-SVL. Dan l-approċċ huwa mifhum li jipprovdi informazzjoni robusta bizżejjed dwar is-serjetà tal-effetti possibbli tat-tkabbir diment li sehem żgħir biss mill-annimali tat-test jitneħħew mill-analiżijiet ($\leq 20\%$). Jekk numru ikbar ta' mrieżeb juru żvilupp lil hinn mill-istadju 60 ($\leq 20\%$), f'koncentrazzjoni nominali waħda jew iktar, għandha ssir ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta fuq l-imrieżeb kollha sabiex jiġu vvalutati l-effetti tat-tkabbir dovuti għal trattamenti kimiċi filwaqt li jiġi kkunsidrat l-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju fuq it-tkabbir. L-Appendiċi 3 jipprovdi gwida dwar l-analiżi ANOVA b'żewġ fatturi tal-piż u t-tul.

LETTERATURA

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase I — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼ **M6**

- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris
- (4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
- (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — *Xenopus* (FETAX). E 1439-98
- (7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, pp. 539-551
- (8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
- (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris
- (10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
- (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris
- (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.

▼ **M6**

Appendiċi 1

Tabella 1

Kundizzjonijiet Sperimentali għall-Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Amfibji fuq 21 jum

Animal tat-Test	Larva <i>Xenopus laevis</i>	
Stadju Inizjali tal-Larva	Stadju 51 ta' Nieuwkoop and Faber	
Perjodu ta' Espożizzjoni	21 jum	
Kriterji tal-Għażla tal-Larva	Stadju tal-iżvilupp u tul totali (mhux obligatorju)	
Konċentrazzjonijiet tat-test	Minimu ta' 3 konċentrazzjonijiet li jvarjaw bejn wiehed u iehor ordni wiehed ta' kobor	
Reġim ta' Espożizzjoni	Fluss kontinwu (preferut) u/jew tiġdid statiku	
Rata tal-Fluss tas-Sistema tat-Test	25 ml/min (sostituzzjoni tal-volum shih bejn wiehed u iehor kull 2,7 siegħa)	
Punti ta' Tmim Primarji / Jiem tal-Istabbiliment	Mortalità	Kuljum
	Stadju tal-Iżvilupp	J 7 u 21
	Tul tas-Sieq ta' Wara	J 7 u 21
	Tul mill-Imnieher sal-Anus	J 7 u 21
	Piż tal-Ġisem Imxarrab	J 7 u 21
	Istoloġija tat-Tirojde	J 21
Ilma ta' Dilwizzjoni / Kontroll tal-Laboratorju	Ilma tal-vit deklorat (iffiltrat għall-karbonju) jew is-sors tal-laboratorju ekwivalenti	
Densità tal-Larva	20 larva / reċipjent tat-test (5 / l)	
Soluzzjoni tat-Test / Reċipjent tat-Test	4-10 l (tal-inqas 10-15 cm ilma) / Reċipjent tat-test tal-ħġieġ jew tal-Azzar Inossidabbli (eż., 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Replikazzjoni	4 reċipjenti tat-test tal-irreplikati / konċentrazzjoni u kontroll tat-test	
Rata ta' Mortalità Aċċettabbli fil-Kontrolli	≤ 10 % għal kull reċipjent tat-test tal-irreplikati	
Fissazzjoni tat-Tirojde	Numru Ffissat	L-imrieżeb kollha (fil-bidu jiġu evalwati 5/irreplikati)
	Reġjun	Ras jew ġisem shih
	Fluwidu tal-Fissazzjoni	Fissattiv ta' Davidson
Tmigh	Ikel	Sera Micron® jew ekwivalenti
	Ammont / Frekwenza	Ara t-Tabella 1 għar-reġim tat-tmigh bl-użu ta' Sera Micron®
Dawl	Fotoperjodu	12-il siegħa Dawl: 12-il siegħa dlam

▼ M6

	Intensità	600 sa 2 000 lux (Imkejl in fil-Wiċċ tal-Ilma)
Temperatura tal-Ilma		22° ± 1 °C
pH		6,5 — 8,5
Konċentrazzjoni ta' Ossigenu Dissolt (DO)		> 3,5 mg/l (> 40 % Saturazzjoni tal-Arja)
Skeda tal-Kampjun Kimiku Analitiku		Darba / Ġimgħa (4 Avvenimenti tal-Kampjun / Test)

▼ **M6***Appendiċi 2***Tabelli tar-rapportar għad-dejta mhux ipproċessata u d-dejta sommarja***Tabella 1***Informazzjoni ġenerali dwar is-sustanza kimika tat-test**

Informazzjoni kimika			
	Dahhal is-sustanza kimika tat-test, l-unitajiet tal-konċentrazzjoni, u t-trattamenti		
	Sustanza kimika tat-test:		
	Unitajiet tal-konċentrazzjoni:		
	Trattament 1		
	Trattament 2		
	Trattament 3		
	Trattament 4		
	Data (jum 0):		Dahhal id-data (xx/jj/ss)
	Data (jum 7):		Dahhal id-data (xx/jj/ss)
	Data (jum 21):		Dahhal id-data (xx/jj/ss)

*Tabella 2***Skedi għall-ġbir ta' dejta mhux ipproċessata għall-jiem 7 u 21**

JUM X
DATA 00/00/00

	Konċen- trazzjoni	Numru tat-Tratta- ment	Numru tal-Irrepli- kat	Numru tal-indi- vidwu	Identifika- tur tal-In- dividwu	Stadju tal- Iżvilupp	Tul tal- SVL (mm)	Tul tas- Sieg ta' Wara (mm)	Piż imxar- rab tal-Or- ganiżmu Shih (mg)
RINGIE- LA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼ **M6**

	Konċen- trazzjoni	Numru tat-Tratta- ment	Numru tal-Irrepli- kat	Numru tal-indi- vidwu	Identifika- tur tal-In- dividwu	Stadju tal- Iżvilupp	Tul tal- SVL (mm)	Tul tas- Sieg ta' Wara (mm)	Piż imxar- rab tal-Or- ganiżmu Shih (mg)
RINGIE- LA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼ **M6**

	Konċen- trazzjoni	Numru tat-Tratta- ment	Numru tal-Irrepli- kat	Numru tal-indi- vidwu	Identifika- tur tal-In- dividwu	Stadju tal- Iżvilupp	Tul tal- SVL (mm)	Tul tas- Sieg ta' Wara (mm)	Piż imxar- rab tal-Or- ganiżmu Shih (mg)
RINGIE- LA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼ **M6**

	Konċen- trazzjoni	Numru tat-Tratta- ment	Numru tal-Irrepli- kat	Numru tal-indi- vidwu	Identifika- tur tal-In- dividwu	Stadju tal- Iżvilupp	Tul tal- SVL (mm)	Tul tas- Sieq ta' Wara (mm)	Piż imxar- rab tal-Or- ganiżmu Shih (mg)
RINGIE- LA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADJU	BL	HLL	PIŻ
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

Sommarji kkalkolati ghad-dejta dwar il-punti ta' tmien mill-jiem 7 u 21

		Stadju tal-Iżvilupp			SVL (mm)		Tul tas-Sieq ta' Wara (mm)		Piż (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDJAN	MASS	MEDJA	ŽVI STD	MEDJU	ŽVI STD	MEDJU	ŽVI STD
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 2.

Dejta dwar il-mortalità ta' kuljum

[illegible]

▼ **M6**

Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Ghadd tal-irreplikati		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ghadd tat-Trattament		0				0				0				0			

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 1.

Tabella 5

Kriterji tal-Kwalità tal-Ilma

Sistema ta' Espozizzjoni (bi fluss kontinwu/tigdid statiku):

Temperatura:

Intensità tad-dawl:

Ċiklu dawl-dlam:

Ikel:

Rata tat-tmigh:

pH tal-ilma:

Konċentrazzjoni tal-jodju fl-ilma tat-test:

▼ **M6**

Tabella 6

Dejta kimika sommarja

Isem is-Sustanza Kimika:																							
Kaž #:																							
Jum tat-Test	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
0	00/00/00																						
1	#Value!																						
2	#Value!																						
3	#Value!																						
4	#Value!																						
5	#Value!																						
6	#Value!																						
7	#Value!																						
8	#Value!																						
9	#Value!																						
10	#Value!																						
11	#Value!																						
12	#Value!																						
13	#Value!																						
14	#Value!																						
15	#Value!																						
16	#Value!																						
17	#Value!																						
18	#Value!																						
19	#Value!																						
20	#Value!																						
21	#Value!																						

Nota: Il-kalkoli taċ-ċelloli huma assoċjati mal-entrati tad-dejta fit-Tabella 1.

▼ **M6**

Tabella 7

Tabelli ghar-rapportar tal-istopatoloġija għall-kriterji ċentrali

Data:

Sustanza kimika:

Patoloġista:

ID tal-Animal tal-Kontroll — irreprikat 2	ID tal-Animal tal-Kontroll — irreprikat 1				Iperetrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Iperetrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplazja taċ-ċelloli follikolari
Total:								

ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 2	ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 1				Iperetrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Iperetrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplazja taċ-ċelloli follikolari
Total:								

ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 2	ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 1				Iperetrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Iperetrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplazja taċ-ċelloli follikolari
Total:								

ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 2	ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 1				Iperetrofija tal-glandola tat-tirojde	Atrofija tal-glandola tat-tirojde	Iperetrofija taċ-ċelloli follikolari	Iperplazja taċ-ċelloli follikolari
Total:								

▼ **M6**

Tabella 8

Kriterji addizzjonali tal-istopatoloġija

Data:

Sustanza kimika:

Patoloġista:

ID tal-Animal tal-Kontroll — irreprikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Animal tal-Kontroll — irreprikat 2		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
Total:			

Animal tad-Doża ID — irreprikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
Animal tad-Doża ID — irreprikat 2		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
Total:			

ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 2		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
Total:			

ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 1		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 2		Żieda fiż-żona tal-lumen follikolari	Tnaqqis fiż-żona tal-lumen follikolari
Total:			

▼ **M6**

Tabella 9

Deskrizzjonijiet narrattivi għal sejbiet istopatoloġiċi

Data:

Sustanza kimika:

Patologista:

Deskrizzjoni narrattiva		
ID tal-Animal tal-Kontroll — irreprikat 1		
ID tal-Animal tal-Kontroll — irreprikat 2		
ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 1		
ID tal-Animal tad-Doża — irreprikat 2		

▼ M6

ID tal-Animal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Animal tad-Doża — irreplikat 2		
ID tal-Animal tad-Doża — irreplikat 1		
ID tal-Animal tad-Doża — irreplikat 2		

Tabella 10

Mudell tat-tabella sommarja ta' rapportar għall-jum × (7 jew 21) tal-AMA

		Kontroll				Doża 1					Doża 2					Doża 3				
Punt ta' tmiem	Irreplikat	Medju	SD	CV	N	Medju	SD	CV	N	valur-p	Medja	SD	CV	N	valur-p	Medja	SD	CV	N	valur-p
Sieq ta' Wara Tul (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			
Piż imxarrab (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			

Tabella 11

Mudell tat-tabella sommarja ta' rapportar ghal dejta dwar l-istadju tal-izvilupp tal-jum × (7 jew 21) għall-AMA

		Kontroll				Doża 1					Doża 2					Doża 3				
	Irreplikat	Medjan	Min	Mass	N	Medjan	Min	Mass	N	valur-p	Medjan	Min	Mass	N	valur-p	Medjan	Min	Mass	Medjan	valur-p
Stadju tal-Izvilupp	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medja:																			

▼ **M6***Appendiċi 3***Analizi alternattiva tal-piż u t-tul fil-każ ta' żvilupp tardiv tal-istadju li jaqbeż l-20 % tal-imrieżeb f'konċentrazzjoni wahda jew iktar**

Jekk numru ikbar ta' mrieżeb juru żvilupp lil hinn mill-istadju 60 ($\geq 20\%$) f'konċentrazzjoni nominali wahda jew iktar, għandha ssir ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta fuq l-imrieżeb kollha biex jiġu vvalutati l-effetti tat-tkabbir minhabba trattamenti kimiċi filwaqt li jittiehed f'kunsiderazzjoni l-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju fuq it-tkabbir.

Il-proposta hija sabiex tintuża d-dejta kollha iżda jinghata kont lill-effett tal-iżvilupp tardiv tal-istadju. Dan jista' jsir b'ANOVA b'żewġ fatturi bi struttura ta' varjanza mbejta. Iddefinixxi StadjuTard = "Iva" għal annimal jekk l-istadju tal-iżvilupp tiegħu huwa 61 jew ikbar. Inkella, iddefinixxi StadjuTard = "Le". F'dak il-każ tista' ssir ANOVA b'żewġ fatturi b'konċentrazzjoni u StadjuTard u l-interazzjoni tagħhom, b'fattur għal għarrieda Rep(Conc) u fattur iehor għal għarrieda Marżebba(Rep). Dan xorta jittratta lir-rep bħala l-unità tal-analizi u essenzjalment jagħti l-istess riżultati bħala analizi ponderata tal-medji tar-rep*stadjutard, ponderati bin-numru ta' annimali għal kull medja. Jekk id-dejta tikser ir-rekwiżiti dwar l-omoġenità tal-varjanza jew in-normalità tal-ANOVA, f'dak il-każ tista' ssir trasformazzjoni tal-ordni tal-klassifikazzjoni normalizzata sabiex titneħħa dik l-oġġezzjoni.

Minbarra t-testijiet-F standard tal-ANOVA għall-effetti ta' Konc, StadjuTard, u l-interazzjonijiet tagħhom, it-test-F tal-interazzjoni jista' jinqasam f'żewġ testijiet-F addizzjonali tal-ANOVA, wiehed fuq ir-risponsi medji fil-konċentrazzjonijiet għal StadjuTard = "Le" u iehor fuq ir-risponsi medji fuq konċentrazzjonijiet għal StadjuTard = "Iva". Isiru wkoll paraguni oħrajn tal-medji tat-trattament kontra l-kontroll fi hdan kull livell ta' StadjuTard. Tista' ssir analizi tat-tip tax-xejra bl-użu tal-kuntrasti xierqa jew jistgħu jsiru paraguni sempliċi bejn il-pari jekk ikun hemm evidenza ta' doża-rispons mhux monotoni fi hdan livell tal-varjabbli ta' StadjuTard. Aġġustament Bonferroni-Holm għall-valuri-p isir biss jekk it-taqsim-F korrispondenti ma tkunx sinifikanti. Dan jista' jsir fl-SAS u, presumibbilment, f'pakketi ta' software statistiċi oħrajn. Jistgħu jirriżultaw kumplikazzjonijiet meta ma jkun hemm ebda annimali bi stadju tardiv f'ċerti konċentrazzjonijiet, iżda dawn is-sitwazzjonijiet jistgħu jiġu ġestiti b'mod dirett.

▼ **M6**

Appendiċi 4

Definizzjonijiet

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ M6

C.39. TEST TAR-RIPRODUZZJONI TAL-KOLLEMBOLANI FIL-HAMRIJA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 232 tal-OECD (2009). Dan il-metodu ta' ttestjar tfassal sabiex jiġu vvalutati l-effetti tas-sustanzi kimiċi fuq ir-riżultati riproduttivi tal-kollembolani fil-hamrija. Huwa bbażat fuq proċeduri eżistenti (1) (2). Il-partenogeneżi ta' *Folsomia candida* u s-sesswalment riproduttivi *Folsomia fimetaria* huma tnejn mill-iktar speċijiet aċċessibbli ta' Kollembola, u huma kolturabbli u disponibbli fis-suq. Meta jkunu jridu jiġu vvalutati habitats speċifiċi mhux koperti mis-sustanzi speċijiet, il-proċedura tista' tiġi estiża wkoll għal speċijiet oħrajn ta' Kollembola jekk kapaċi jissodisfaw il-kriterji tal-validità tat-test.
2. Kollembola li jgħixu fil-hamrija huma speċijiet ekoloġikament relevanti għall-ittestjar ekotossikoloġiku. Il-kollemboli huma esapodi b'eksoskelettu rġiq ferm permeabbli għall-arja u l-ilma, u jirrapprezentaw speċijiet ta' artropodi b'rotta differenti u rata differenti ta' espożizzjoni meta mqabblin mal-hniex u l-enkitraedi.
3. Id-densitajiet tal-popolazzjoni tal-Kollembola spiss jilhqnu $1-10^5 \text{ m}^{-2}$ fil-hamrija u s-saffi ta' skart tal-weraq f'hafna ekosistemi terrestri (3) (4). L-adulti tipikament ikunu twal 0,5 — 5 mm, il-kontribuzzjoni tagħhom għar-respirazzjoni u l-bijomassa totali tal-annimali tal-hamrija hija baxxa, stmata bejn 1 % u 5 % (5). Għalhekk, l-iktar rwol importanti tagħhom jista' jkun bħala regolaturi potenzjali tal-proċessi permezz ta' predazzjoni tal-mikrobivori u mikrofawna. L-ispringtails huma annimali tal-priża għal firxa wiesgħa ta' invertebrati endoġeni u epigeiċi, bħal dud, ċentopiedi, brimb, Carabidae u kappillani. Il-Kollembola jikkontribwixxu għall-proċessi ta' dekompożizzjoni f'hamrija aċidużi fejn jistgħu jkunu l-iktar invertebrati importanti tal-hamrija minbarra enkitraedi, peress li normalment il-hniex u d-diplopodi jkunu niqsin.
4. *F. fimetaria* għandha distribuzzjoni madwar id-dinja u hija komuni f'diversi tipi ta' hamrija li jvarjaw minn hamrija mrammla sa raba' kif ukoll hamrija aċidużi u oħrajn li mhumiex. Hija kollembolan mingħajr għajnejn u bla pigment. Ġiet irreġistrata fil-hamrija agrikoli madwar l-Ewropa kollha (6). Għandha drawwa ta' ikel omnivoru, inkluzi ifa fungali, batterji, protozoa u detriti fl-alimentazzjoni tagħha. Tinteragixxi permezz ta' ragħha b'infezzjonijiet ta' fungi patoġeniċi tal-pjanti (7) u tista' tinfluwenza l-mikorrozza, kif inhu magħruf li huwa l-każ għal *F. candida*. Bħal hafna mill-ispeċijiet kollembolani, tirriproduċi sesswalment u tehtieg il-preżenza permanenti tar-ragel għall-fertilizzazzjoni tal-bajd.
5. *F. candida* hija distribwita madwar id-dinja wkoll. Għad li mhijiex komuni f'hafna mill-hamrija naturali, spiss issibha f'numru kbar hafna f'siti rikki f'hamrija humus. Hija kollembolan mingħajr għajnejn u bla pigment. Għandha furka żviluppata sew (organu biex taqbeż) u moviment ta' ġiri attiv u taqbeż mill-ewwel meta disturbata. Ir-rwol ekoloġiku ta' *F. candida* jixbah ir-rwol ta' *F. fimetaria*, iżda l-habitats huma hamrija iktar organika u rikki. Tirriproduċi partenogenetikament. L-irġiel jistgħu jkunu inqas minn 1 f'elf.

PRINĊIPJU TAT-TEST

6. Kollembola adulti (*F. fimetaria*) jew żgħar (*F. candida*) sinkroniċi huma esposti għal medda ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test imħallta f'hamrija artifiċjali mmodifikata (8) bl-użu ta' kontenut ta' materja organika ta' 5 % (jew hamrija oħra). Ix-xenarju tat-test jista' jinqasam f'żewġ stadji:

— Test tas-sejbien tal-medda, fil-każ li ma jkunx hemm biżżejjed informazzjoni dwar it-tossicità disponibbli, li fih il-mortalità u r-riproduzzjoni

▼ **M6**

jkunu l-punti ta' tmiem ewlenin ivvalutati wara ġimghatejn għal *F. fimetaria* u 3 ġimghat għal *F. candida*.

- Test definittiv tar-riproduzzjoni li fih jiġi vvalutat n-numru totali ta' żgħar prodotti mill-annimali ġenituri u s-sopravivenza tal-annimali ġenituri. It-tul ta' dan it-test definittiv huwa ta' 3 ġimghat għal *F. fimetaria* jew 4 ġimghat għal *F. candida*.

L-effett tossiku tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-riżultati tal-mortalità u tar-riproduzzjoni tal-adulti jingħata bħala LC_{50} u EC_{50} billi d-dejta titqiegħed f'mudell xieraq permezz ta' rigressjoni mhux lineari biex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaguna mortalità ta' x % jew tnaqqis fir-riżultat tar-riproduzzjoni, rispettivament, jew inkella bħala l-valur NOEC/LOEC (9).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Preferibbilment għandhom ikunu magħrufa l-karatteristiċi fiżiċi, is-solubbiltà fl-ilma, il-log K_{ow} , il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-ilma hamrija u l-pressjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test. Tajjeb li jkun hemm informazzjoni addizzjonali dwar l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija, bħar-rati tal-fotolizi u idrolizi u d-degradazzjoni bijotika. L-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont in-nomenklatura tal-IUPAC, in-numru tas-CAS, il-lott, il-formula strutturali u l-purità għandha tiġi ddokumentata meta disponibbli.
8. Dan il-Metodu ta' Ttestjar jista' jintuża għal sustanzi li jinhallu u dawk li ma jinhallux fl-ilma. Madankollu, il-modalità ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ser tvarja skont il-każ. Il-metodu ta' ttestjar mhuwiex applikabbli għal sustanzi kimiċi volatili, jiġifieri sustanzi kimiċi għal liema l-kostant ta' Henry jew il-koeffiċjent ta' partizzjoni arja/ilma huwa ikbar minn wiehed, jew is-sustanzi kimiċi għal liema l-pressjoni tal-fwar taqbeż 0,0133 Pa f'25 °C.

VALIDITÀ TAT-TEST

9. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji li ġejjin fil-kontrolli mhux ittrattati sabiex riżultat tat-test jitqies validu:
 - Il-mortalità medja fl-adulti ma għandhiex taqbeż 1-20 % fi tmiem it-test;
 - In-numru medju ta' żgħar għal kull reċipjent għandu jkun tal-inqas 100 fi tmiem it-test;
 - Il-koeffiċjent ta' varjazzjoni kkalkolat għan-numru ta' żgħar għandu jkun inqas minn 30 % fi tmiem it-test definittiv.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

10. Sustanza kimika ta' referenza għandha tiġi ttestjata fil-konċentrazzjoni EC_{50} tagħha għat-tip ta' hamrija tat-test magħżul f'intervalli regolari jew inkella possibbilment inkluża f'kull test sabiex jiġi vverifikat li r-rispons tal-organizmi tat-test fis-sistema tat-test qiegħed fi hdan il-livell normali. Sustanza kimika ta' referenza xierqa hija aċidu boriku, li għandu jnaqqas ir-riproduzzjoni b'50 % (10 (11) f'madwar 100 mg/kg piż xott tal-hamrija għaž-żewġ speċijiet.

DESKRIZZJONI TAT-TEST

Reċipjenti u tagħmir tat-test

11. Kontenituri li jifilhu 30 g hamrija niedja huma reċipjenti tat-test xierqa. Il-materjal għandu jkun tal-ħġieġ jew tal-plastik inert (mhux tossiku). Madankollu, l-użu ta' kontenituri tal-plastik għandu jiġi evitat jekk l-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test tonqos minhabba sorbiment. Ir-reċipjenti tat-test

▼ **M6**

għandu jkollhom żona trażversali li tippermetti sabiex il-fond propju tal-hamrija fir-reċipjent tat-test ikun 2-4 cm. Ir-reċipjenti għandu jkollhom ghot-jien (eż. ħġieġ jew polietilen) imfaslin biex inaqqsu l-evaporazzjoni tal-ilma filwaqt li jippermettu li jgħaddu gassijiet bejn il-hamrija u l-atmosfera. Il-kontenitur għandu jkun tal-inqas parzjalment trasparenti biex ikun jista' jgħaddi d-dawl.

12. Huwa mehtieġ tagħmir normali tal-laboratorju, speċifikament dawn li ġejjin:

- armadju tat-tnixxif;
- sterjomikroskopju;
- metru tal-pH u metru tad-dawl;
- imwieżen preċiżi xierqa;
- tagħmir adegwat għall-kontroll tat-temperatura;
- tagħmir adegwat għall-kontroll tal-umdità (mhux essenzjali jekk ir-reċipjenti tal-espożizzjoni ikunu mghottija bl-ghotjien);
- inkubatur jew kamra żghira bit-temperatura kkontrollata;
- forċipi jew apparat tal-fluss tal-arja b'irdigh baxx.

Thejjija tal-hamrija tat-test

13. Tintuża hamrija artifiċjali mmodifikata (8) b'kontenut ta' materja organika ta' 5 %. Inkella tista' tintuża hamrija naturali, peress li l-hamrija artifiċjali ma tixbahx lil hamrija naturali. Il-kompożizzjoni rrakkomandata tal-hamrija artifiċjali hija kif ġej (ibbazata fuq piżijiet nixfin, imnixxfin għal piż kostanti f'105 °C):

- 5 % pit ta' sfanju, imnixxef bl-arja u mithun fin (daqs ta' partikola ta' 2 ± 1 mm huwa aċċettabbli);
- 20 % tafal tal-kawlina (kontenut ta' kaolinit preferibbilment iktar minn 30 %);
- madwar 74 % ramel industrijali mnixxef bl-arja (skont l-ammont ta' CaCO_3 mehtieġ), prinċipalment ramel irqiq b'aktar minn 50 % tal-frak bejn 50 u 200 mikron. L-ammont eżatt ta' ramel jiddependi fuq l-ammont ta' CaCO_3 (ara hawn taht), flimkien għandhom jagħmlu 75 %.
- 1,0 % karbonat tal-kalċju (CaCO_3 , pulverizzat, grad analitiku) biex jinkiseb pH ta' $6,0 \pm 0,5$; l-ammont ta' karbonat tal-kalċju li għandu jiddependi jiddependi prinċipalment fuq il-kwalità/natura tal-pit (ara Nota 1).

Nota 1: L-ammont ta' CaCO_3 mehtieġ ser ikun jiddependi mill-komponenti tas-substrat tal-hamrija u għandu jiġi stabbilit billi titkejjel il-pH tas-subkampjuni tal-hamrija niedja preinkubata eżatt qabel it-test.

Nota 2: Huwa rrakkomandat li titkejjel il-pH u jistgħu jitkejlu wkoll il-proporzjon C/N, il-Kapaċità ta' Skambju ta' Katjoni (CEC) u l-kontenut ta' materja organika tal-hamrija sabiex tkun tista' ssir normalizzazzjoni fi stadju iktar tard u jiġu interpretati ahjar ir-rizultati.

Nota 3: Jekk mehtieġ, eż. għal skopijiet speċifiċi ta' ttestjar, hamrija naturali minn siti mhux imniġġsin jistgħu jservu ta' test u/jew substrat tal-koltura wkoll. Madankollu, jekk tintuża hamrija naturali, għandha tiġi kkaratterizzata tal-inqas skont l-orijini (sit ta' ġbir), il-pH, is-sawra (distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli), is-CEC u l-kontenut ta' materja organika u għandha tkun hielsa minn kwalunkwe kontaminazzjoni. Għal hamrija naturali huwa rrakkomandat li tintwera l-adegwatezza tagħha għal test u għall-ilhuq tal-kriterji ta' validità tat-test qabel ma tintuża l-hamrija f'test definittiv.

▼ M6

14. Il-kostitwenti nixfin tal-hamrija huma mhalltin sew (eż. f'hallat tal-laboratorju fuq skala kbira). Il-kapjenza massima tal-ilma (WHC) tal-hamrija artifiċjali hija stabbilita skont il-proċeduri deskritti fl-Appendiċi 5. Il-kontenut ta' umdità tal-hamrija tal-ittestjar għandu jiġi ottimizzat sabiex tinkiseb struttura tal-hamrija poruża laxxa li tippermetti sabiex il-kollembolani jidhlu fil-pori. Normalment, dan uwa bejn 40-60 % tad-WHC massima.
15. Il-hamrija artifiċjali niexfa tixxarrab minn qabel billi jiżdied biżżejjed ilma dejonizzat biex jinkiseb madwar nofs il-kontenut finali ta' ilma 2-7 ijiem qabel jibda t-test, sabiex tiġi ekwibrata/stabbilizzata l-aċidità. Sabiex tiġi stabbilita pH, tintuża tahlita ta' hamrija u soluzzjoni ta' 1 M klorur tal-potassju (KCl) jew 0,01 M klorur tal-kalċju (CaCl_2) fi proporzjon ta' 1:5 (skont l-Appendiċi 6). Jekk il-hamrija hija iktar aċiduża mill-medda mehtieġa, tista' tiġi aġġustata billi jiżdied ammont xieraq ta' CaCO_3 . Jekk il-hamrija hija alkalina wisq, tista' tiġi aġġustata billi jiżdied aċidu inorganiku li ma jagħmilx hsara lill-kollembolani.
16. Il-hamrija mxarrba minn qabel tinqasam f'porzjonijiet li jaqblu man-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test (u s-sustanza kimika ta' referenza fejn xieraq) u l-kontrolli użati għat-test. Jiddaħhlu s-sustanzi kimiċi tat-test u jiġi rregolat il-kontenut ta' ilma skont il-paragrafu 24.

Għażla u thejġija tal-annimali tat-test

17. Il-partenogenetika *F. candida* hija l-ispeċi rrakkomandata, peress li fir-ring testing tal-metodu ta' ttestjar (11), din l-ispeċi ssodisfa il-kriterji ta' validità għas-sopravivenza hafna iktar mill-*F. fimetaria*. Jekk tintuża speċi oħra, din trid tissodisfa l-kriterji ta' validità spjegati fil-paragrafu 9. Fil-bidu tat-test, l-annimali għandhom ikunu mitmugħin sew u jkollhom età ta' bejn 23-26 jum għal *F. fimetaria* u 9-12-il jum għal *F. candida*. Għal kull irreprikat, in-numru ta' *F. fimetaria* għandu jkun ta' 10 irġiel u 10 nisa, u għal *F. candida* għandhom jintużaw 10 nisa (ara l-Appendiċi 2 u l-Appendiċi 3). L-annimali sinkroniċi jingħaḥu għal għarrieda mid-dixxijiet u l-kundizzjoni tas-saħħa u fiżika tagħhom tiġi vverifikata għal kull lott imdaħħal f'irreprikat. Kull grupp ta' 10/20 individwu jiddaħħal f'kontenitur tat-test magħżul għal għarrieda u jingħaḥu n-nisa l-kbar tal-*F. fimetaria* sabiex tiġi żgurata distinzjoni xierqa mill-*F. fimetaria* rġiel.

Thejġija tal-konċentrazzjonijiet tat-test

18. Jistgħu jintużaw erba' metodi ta' applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test: 1) tahlit tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija bl-ilma bħala trasportatur, 2) tahlit tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija b'solvent organiku bħala trasportatur, 3) tahlit tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija bir-ramel bħala trasportatur, jew 4) applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-hamrija. L-għażla tal-metodu xieraq jiddependi mill-karatteristika tas-sustanza kimika u l-iskop tat-test. B'mod ġenerali, huwa rrakkomandat it-tahlit tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija. Madankollu, jistgħu jkunu mehtieġa proċeduri ta' applikazzjoni li huma konsistenti mal-użu prattiku tas-sustanza kimika tat-test (eż. sprejjar tal-formulazzjoni likwida jew l-użu ta' formulazzjonijiet ta' pestiċidi speċjali bħal bċejjeċ żgħar jew tlestija taż-żerriegħa). Il-hamrija tiġi ttrattata qabel ma jiddaħhlu l-kollembolani, hlief meta s-sustanza kimika tat-test tiddaħhal f'wiċċ il-hamrija, il-kollembolani għandhom jithallew jidhlu fil-hamrija.

Sustanza kimika tat-test li tinhall fl-ilma

19. Soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test tithejja filma dejonizzat fi kwantità biżżejjed għall-irreprikati kollha ta' konċentrazzjoni wahda tat-test. Kull soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test tithallat sew ma' lott hamrija mxarrba minn qabel qabel ma tiddaħhal fir-reċipjent tat-test.

Sustanza kimika tat-test li ma tinhallx fl-ilma

20. Għal sustanzi kimiċi li ma jinhallux fl-ilma, izda jinhallu f'solventi organiċi, is-sustanza kimika tat-test tista' tinhall fl-iżgħar volum possibbli ta' solvent

▼ M6

xieraq (eż. aċetun) li xorta waħda jiżgura tahlit xieraq tas-sustanza kimika fil-hamrija u tithallat ma' porzjon tar-ramel kwarzuż meħtieġ. Għandhom jintużaw solventi volatili biss. Meta jintuża solvent organiku, il-koncentrazzjonijiet kollha tat-test u kontroll addizzjonali negattiv bis-solvent għandu jkun fihom l-istess ammont minimu tas-solvent. Il-kontenituri tal-applikazzjoni għandhom jithallaw mikxufin għal ċertu perjodu biex is-solvent assoċjat mal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ikun jista' jevapora, u jiġi żgurat li ma ssir ebda dissipazzjoni tas-sustanza kimika tul dan iż-żmien.

Sustanza kimika tat-test li bilkemm tinhall fl-ilma u f'solventi organiċi

21. Għal sustanzi kimiċi li bilkemm jinhallu fl-ilma u f'solventi organiċi, ir-ramel kwarzuż, li għandu jkun parti mir-ramel totali mdahħal fil-hamrija, jithallat mal-kwantità tas-sustanza kimika tat-test sabiex tinkiseb il-koncentrazzjoni mixtieqa tat-test. Din it-tahlita ta' ramel kwarzuż u sustanza kimika tat-test tiddahħal fil-hamrija mxarrba minn qabel u tithallat sew wara li jiddahħal ammont xieraq ta' ilma dejonizzat sabiex jinkiseb il-kontenut meħtieġ ta' umdità. It-tahlita finali tinqasam bejn ir-reċipjenti tat-test. Il-proċedura tiġi ripetuta għal kull konċentrazzjoni tat-test u jithejja kontroll xieraq ukoll.

Applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fuq wiċċ il-hamrija

22. Meta s-sustanza kimika tat-test tkun pestiċida, jista' jkun xieraq li tiġi applikata fuq wiċċ il-hamrija billi tiġi sprejjata. Il-hamrija tiġi ttrattata wara li jiżdiedu l-kollembolani. L-ewwel il-kontenituri tat-test jimtlew bis-substrat tal-hamrija mxarrba, jiddahħlu l-annimali u mbagħad jintiżnu l-kontenituri tat-test. Sabiex tiġi evitata kwalunkwe espożizzjoni diretta tal-annimali għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' kuntatt dirett, is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata tal-inqas nofs siegħa wara li jiżdiedu l-Kollembola. Is-sustanza kimika tat-test għandha tiġi applikata fuq wiċċ il-hamrija b'mod imqassam tajjeb kemm jista' jkun bl-użu ta' apparat xieraq li jisprejja fuq skala tal-laboratorju li jkun jixbah l-applikazzjoni bi sprej fl-ghelieqi. L-applikazzjoni għandha ssir f'temperatura fi hdan ± 2 °C tal-varjazzjoni u għal soluzzjonijiet milwiema, emulsjonijiet jew dispersjonijiet b'rata ta' applikazzjoni tal-ilma skont ir-rakkomandazzjonijiet tal-valutazzjoni tar-riskju. Ir-rata għandha tiġi vverifikata bl-użu ta' teknika xierqa ta' kalibraġġ. Formulazzjonijiet speċjali bħal bċejjeċ żgħar jew tlestija taż-zerriegħa jistgħu jiġu applikati b'mod konsistenti mal-użu agrikolu. L-ikel jiżdied wara l-isprejjar.

PROCEDURA

Kundizzjonijiet tat-test

23. It-temperatura medja tat-test għandha tkun ta' 20 ± 1 °C b'medda tat-temperatura ta' 20 ± 2 °C. It-test isir f'ċikli ta' dawl-dlam ikkontrollati (idealment 12-il siegħa dawl u 12-il siegħa dlam) b'illuminazzjoni ta' 400 sa 800 lux f'iz-żona tar-reċipjenti tat-test.
24. Sabiex tiġi vverifikata l-umdità tal-hamrija, ir-reċipjenti jintiżnu fil-bidu, fin-nofs u fi tmiem it-test. Telf ta' piż ta' > 2 % tpatti għalih zieda ta' ilma dejonizzat. Ta' min jinnota li t-telf tal-ilma jista' jitnaqqas billi tinzamm umdità għolja tal-arja (> 80 %) fl-inkubatur tat-test.
25. Il-pH għandha titkejjel fil-bidu u fi tmiem kemm it-test ta' sejbien tal-medda kif ukoll fit-test definittiv. Il-kejl għandhom isiru f'kampjun ta' kontroll wiehed żejjed u kampjun żejjed wiehed mill-kampjuni ta' hamrija ttrattati (il-koncentrazzjonijiet kollha) imhejjijin u miżmumin bl-istess mod bħall-kolturi tat-test, izda bla ma jiżdiedu l-kollembolani.

Proċedura u kejl tat-test

26. Għal kull konċentrazzjoni tat-test, ammont tal-hamrija tat-test li jikkorrispondi għal 30 g piż frisk jitqiegħed fir-reċipjent tat-test. Jithejju ukoll

▼ M6

- kontrolli tal-ilma, minghajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuza veikolu għall-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test, għandha ssir serje ta' kontroll li jkun fiha l-veikolu wahdu minbarra s-serje tat-test. Il-koncentrazzjoni tas-solvent jew id-dispersiv għandha tkun l-istess bħal dik użata fir-reċipjenti tat-test li fihom is-sustanza kimika tat-test.
27. L-ispringtails individwali jiġu ttrasferiti bir-reqqa f'kull reċipjent tat-test (allokati għal għarrieda fir-reċipjenti tat-test) u jitqieghdu f'wiċċ il-hamrija. Għal trasferiment effiċjenti tal-annimali jista' jintuza apparat tal-fluss tal-arja b'ir-digh baxx. In-numru ta' rreplikati għall-koncentrazzjonijiet tat-test u għall-kontrolli jiddependi mid-disinn tat-test użat. Ir-reċipjenti tat-test jitqieghdu għal għarrieda fl-inkubatur tat-test u dawn il-pożizzjonijiet jerġghu jingħazlu għal għarrieda kull ġimgħa.
28. Għat-test tal-*F. fimetaria* għandhom jintużaw ghoxrin adult, 10 irġiel u 10 nisa, b'e'tà ta' 23-26 jum għal kull reċipjent tat-test. Fil-jum 21, il-kollembolani jiġu estratti mill-hamrija u jingħaddu. Għal *F. fimetaria*, is-sessi jiġu diskriminati skont id-daqs fil-lott tal-annimali sinkronizzati użat għat-test. In-nisa huma ferm ikbar mill-irġiel (Ara l-Appendiċi 3).
29. Għat-test tal-*F. candida*, għandhom jintużaw għaxar zġhar b'e'tà ta' 9-12-il jum għal kull reċipjent tat-test. Fil-jum 28, il-kollembolani jiġu estrattati mill-hamrija u jingħaddu.
30. Bħala sors tal-ikel xieraq, fil-bidu tat-test u wara madwar ġimgħatejn jiżdied ma' kull kontenitur ammont suffiċjenti, eż. 2-10 mg, ta' ħmira mnixxa u mfarrka tal-furnar, disponibbli fis-suq għal użu domestiku.
31. Fi tmiem it-test, jiġu vvalutati l-mortalità u r-riproduzzjoni. Wara 3 ġimgħat (*F. fimetaria*) jew 4 ġimgħat (*F. candida*), il-kollembolani jiġu estrattati mill-hamrija tat-test (ara l-Appendiċi 4) u jingħaddu (12). Kollembolan jiġi rreġistrat mejjiet jekk ma jinstabx fl-estrazzjoni. Il-metodu ta' estrazzjoni u għadd għandu jiġi vvalidat. Il-validità tinkludi effiċjenza fl-estrazzjoni taż-żgħar oghla minn 95 %, eż. billi jiżdied numru magħruf fil-hamrija.
32. Sommarju Prattiku u skeda taż-żmien tal-proċedura tat-test huma spjegati fl-Appendiċi 2.

Disinn tat-test*Test ta' sejbien tal-medda*

33. Meta jkun hemm bżonn, isir test ta' sejbien tal-medda, pereżempju, b'ħames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test ta' 0,1, 1,0, 10, 100, u 1 000 mg/kg piż xott ta' ħamrija u żewġ irreplikati għal kull trattament u kontroll. Informazzjoni addizzjonali, minn testijiet b'sustanzi kimiċi simili jew minn tagħrif, dwar il-mortalità jew ir-riproduzzjoni tal-Kollembola, tista' tkun siewja wkoll meta tittiehed deċiżjoni fuq il-medda ta' konċentrazzjonijiet li ser jintużaw fit-test ta' sejbien tal-medda.
34. Id-durata tat-test ta' sejbien tal-medda hija ta' ġimgħatejn għal *F. fimetaria* u 3 ġimgħat għal *F. candida* sabiex jiġi żgurat li giet prodotta tqeghida wahda ta' zġhar. Fi tmiem it-test, jiġu vvalutati l-mortalità u r-riproduzzjoni tal-Kollembola. Għandhom jiġu rreġistrati n-numru ta' adulti u l-okkorrenza ta' zġhar.

Test finali

35. Għad-determinazzjoni tal-EC_x (eż. EC₁₀, EC₅₀), għandhom jiġu ttestjati tnax-il konċentrazzjoni. Huma rrakkomandati minimu ta' żewġ irreplikati għal kull trattament b'konċentrazzjoni tat-test u sitt irreplikati tal-kontroll. Il-fattur ta' spazjar jista' jvarja skont il-mudell tad-doża-rispons.

▼ M6

36. Għad-determinazzjoni tal-NOEC/LOEC, għandhom jiġu ttestjati tal-inqas hames konċentrazzjonijiet f'sensiela ġeometrika. Huma rrakkomandati erba' rreplikati għal kull trattament bil-konċentrazzjoni tat-test flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiferrxu b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.
37. Approċċ kombinat jippermetti li jiġu stabbiliti kemm l-NOEC/LOEC kif ukoll l-EC_x. Għal dan l-approċċ kombinat, għandhom jintużaw tmien konċentrazzjonijiet tat-trattament f'sensiela ġeometrika. Huma rrakkomandati erba' rreplikati għal kull trattament flimkien ma' tmien kontrolli. Il-konċentrazzjonijiet għandhom jiferrxu b'fattur li ma jaqbiżx il-1,8.
38. Jekk ma jiġi osservat ebda effett fl-ogħla konċentrazzjoni fit-test ta' sejbien tal-medda (jiġifieri 1 000 mg/kg), it-test tar-riproduzzjoni jista' jsir bħala test tal-limitu, bl-użu ta' konċentrazzjoni tat-test ta' 1 000 mg/kg u l-kontroll. Test tal-limitu ser jipprovi l-opportunità li jintwera li ma hemm ebda effett statistikament sinifikanti fil-konċentrazzjoni limitu. Għandhom jintużaw tmien irreplikati kemm għall-hamrija ttrattata kif ukoll għall-kontroll.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

39. Ir-riżultat tar-riproduzzjoni huwa l-punt ta' tmiem ewlieni (eż. in-numru ta' żgħar prodotti għal kull reċipjent tat-test). L-analiżi statistika, eż. il-proċeduri tal-ANOVA, tqabbel it-trattamenti skont it-test-t ta' Student, it-test ta' Dunnett, jew it-test ta' Williams. L-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 % huma kkalkolati għal medji tat-trattamenti individwali.
40. In-numru ta' adulti sopravvissuti fil-kontrolli mhux ittrattati huwa kriterju ta' validità kbir u għandu jiġi ddokumentat. Bhal fit-test ta' sejbien tal-medda, is-sinjali dannużi kollha l-oħrajn għandhom jiġu rrapportati fir-rapport finali wkoll.

LC_x u EC_x

41. Il-valuri EC_x, inklużi l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % inferjuri u superjuri assoċjati magħhom għall-parametru huma kkalkolati bl-użu ta' metodi statistiċi xierqa (eż. il-funzjoni logistika jew Weibull, il-metodu Spearman-Kärber trimmjat, jew sempliċi interpolazzjoni). EC_x tinkiseb billi jiddaħhal valur li jikkorrispondi għal x % tal-medja tal-kontroll fl-ekwazzjoni misjuba. Biex tiġi kkalkolata l-EC₅₀ jew kwalunkwe EC_x oħra, is-sett shih ta' dejta għandu jkun soġġett għal analiżi tar-rigressjoni. LC₅₀ normalment tiġi stmata permezz ta' analiżi probit jew analiżi simili li tiegħu f'kunsiderazzjoni d-dejta dwar il-mortalità distribwita b'mod binomjali.

NOEC/LOEC

42. Jekk analiżi statistika tkun mahsuba sabiex tistabbilixxi l-NOEC/LOEC, hemm bżonn tal-istatistika għal kull reċipjent (reċipjenti individwali jitqiesu li huma rreplikati). Għandhom jintużaw metodi statistiċi xierqa skont id-Dokument 54 tal-OECD dwar l-Approċċi Attwali fl-Analiżi Statistika tad-Dejta dwar l-Ekotoossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (9). B'mod ġenerali, effetti avversi tas-sustanza kimika tat-test meta mqabbla mal-kontroll huma investigati bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi fuq naha waħda b' $p \leq 0,05$.
43. Distribuzzjoni normali u omoġenità tal-varjanza jistgħu jiġu ttestjati bl-użu ta' test statistiku xieraq, eż. it-test ta' Shapiro-Wilk u t-test ta' Levene, rispettivament ($p \leq 0,05$). Jistgħu jsiru analiżi tal-Varjanza Unidirezżjonali

▼ **M6**

(ANOVA) u testijiet multiparaguni sussegwenti. Jistghu jintużaw testijiet b'bosta paraguni (eż. it-test ta' Dunnett) jew testijiet tax-xejriet rigressivi (eż. it-test ta' Williams) sabiex jiġi kkalkolat jekk hemmx differenzi importanti ($p \leq 0,05$) bejn il-kontrolli u l-bosta konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test (għażla tat-test irrakkomandat skont id-Dokument 54 tal-OECD (9)). Inkella, jistghu jintużaw metodi mhux parametriċi (eż. test-U-Bonferroni skont it-test tax-xejriet ta' Holm jew Jonckheere-Terpstra) sabiex jiġu stabbiliti l-NOEC u l-LOEC.

Test tal-limitu

44. Jekk sar test tal-limitu (paragun tal-kontroll u trattament wiehed biss) u l-prerekwiziti tal-proċeduri tat-test parametrik (normalità, omogenità) huma ssodisfati, ir-risponsi metriċi jistghu jiġu evalwati mit-test ta' Student (test-t). Jista' jintuża t-test-t tal-varjanza mhux ugwali (test-t ta' Welch) jew test mhux parametrik, bħat-test-U ta' Mann-Whitney, jekk dawn ir-rekwiziti ma jiġux issodisfati.
45. Biex jiġu ddeterminati differenzi sinifikanti bejn il-kontrolli (kontroll u kontroll tas-solvent), ir-repliki ta' kull kontroll jistghu jiġu ttestjati kif deskritt għat-test tal-limitu. Jekk dawn it-testijiet ma jidentifikawx differenzi sinifikanti, ir-repliki tal-kontroll u tal-kontrolli tas-solventi kollha jistghu jiġu raggruppati. Inkella t-trattamenti kollha għandhom jitqabblu mal-kontroll tas-solvent.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test

- l-identità tas-sustanza kimika tat-test, il-lott u n-numru tas-CAS, il-purità;
- il-karatteristiċi fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test (eż. il-log Kow, is-solubilità fl-ilma, il-pessjoni tal-fwar, il-kostanti ta' Henry (H) u idealment informazzjoni fuq l-eżitu tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija) jekk disponibbli;
- il-formulazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u l-addittivi għandhom jiġu speċifikati jekk ma tiġix ittestjata s-sustanza kimika pura;

Organizmi tat-test

- identifikazzjoni tal-ispeċijiet u l-fornitur tal-organizmi tat-test, deskrizzjoni tal-kundizzjonijiet tat-tgħammir u l-medda tal-etajiet tal-organizmi tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test

- deskrizzjoni tad-disinn u l-proċedura tal-esperiment;
- dettalji dwar it-thejija tal-hamrija tat-test; speċifikazzjoni ddettaljata jekk tintuża hamrija naturali (l-oriġini, l-istorja, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli, il-pH, il-kontenut ta' materja organika);
- il-kapjenza tal-ilma tal-hamrija;
- deskrizzjoni tat-teknika uzata biex is-sustanza kimika tat-test tiġi applikata għall-hamrija;
- il-kundizzjonijiet tat-test: l-intensità tad-dawl, id-durata taċ-ċikli ta' dawl-dlam, it-temperatura;
- deskrizzjoni tar-reġim tat-tmigh, it-tip u l-ammont ta' ikel użat fit-test, id-dati tat-tmigh;
- il-pH u l-kontenut ta' ilma tal-hamrija fil-bidu u fi tmiem it-test (kontroll u kull trattament);
- deskrizzjoni ddettaljata tal-metodu ta' estrazzjoni u l-effiċjenza tal-estrazzjoni;

▼ **M6***Riżultati tat-test*

- in-numru ta' żgħar stabbilit f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;
- in-numru ta' adulti u l-mortalità tagħhom (%) f'kull reċipjent tat-test fi tmiem it-test;
- deskrizzjoni tas-sintomi fiżjoloġiċi jew patoloġiċi ovvji jew tal-bidliet ċari fl-imġiba;
- ir-riżultati miksuba bis-sustanza kimika tat-test ta' referenza;
- il-valuri tal-NOEC/LOEC, LC_x għall-mortalità u l-EC_x għar-riproduzzjoni (l-iktar LC₅₀, LC₁₀, EC₅₀, u EC₁₀) flimkien mal-intervalli ta' kunfidenza ta' 95 %. Graff tal-mudell adattat użat għall-kalkolu, l-ekwazzjoni tal-funzjoni tiegħu u l-parametri tiegħu (Ara (9));
- l-informazzjoni u l-osservazzjonijiet kollha siewja sabiex jiġu interpretati r-riżultati;
- is-saħħa tat-test propju jekk isir l-ittestjar tal-ipotezi (9);
- id-devjazzjonijiet mill-proċeduri deskritti f'dan il-Metodu ta' Ttestjar u kwalunkwe okkorrenza mhux tas-soltu matul it-test;
- il-validità tat-test;
- għall-NOEC, meta stmata, id-differenza identifikabbli minima.

LETTERATURA

- (1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve
- (3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- (4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388
- (5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. *Acta Zoologica Fennica* 195: 111-118
- (6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychiurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268
- (8) Il-Kapitolu C.36 ta' dan l-Anness, *Test tar-riproduzzjoni tad-Dud Predatorju (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) fil-ħamrija*.
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- (10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼ M6

- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fime-taria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.
- (12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205
- (13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- (14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416
- (15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼ **M6***Appendici 1***Definizzjonijiet**

Id-definizzjonijiet li ġejjin huma applikabbli għal dan il-metodu ta' ttestjar (f'dan it-test, il-konċentrazzjonijiet effettivi kollha jingħataw bhala massa tas-sustanza kimika tat-test għal kull massa niexfa tal-hamrija tat-test):

Sustanza kimika hija sustanza jew tahlita.

NOEC (konċentrazzjoni minghajr effetti osservabbli) hija l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li fiha ma huwa osservat ebda effett. F'dan it-test, il-konċentrazzjoni li tikkorrisponi għall-NOEC, ma għandha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) fi hdan perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbel mal-kontroll.

LOEC (konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat) hija l-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li għandha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) fi hdan perjodu ta' espożizzjoni partikolari meta mqabbla mal-kontroll.

EC_x (Konċentrazzjoni tal-effett għall-effett ta' x %) hija l-konċentrazzjoni li tikkawża x % tal-effett fuq l-organizmi tal-ittestjar f'perjodu ta' espożizzjoni meta mqabbel ma' kontroll. Pereżempju, EC₅₀ hija konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' espożizzjoni ddefinit.

Is-sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ M6

Appendiċi 2

L-azzjonijiet ewlenin u skeda ta' żmien għat-twettiq ta' test tal-kollembolani

L-istadji tat-test jistgħu jingabru fil-qosor kif ġej:

Hin (gurnata)	Azzjoni
– 23 sa – 26	Thejjija tal-koltura tal- <i>F. fimetaria</i> sinkronika
– 14	Hejji l-hamrija artifiċjali (tahlit tal-kostitwenti nixfin) Ivverifika l-pH tal-hamrija artifiċjali u aġġustaha kif xieraq Kejjel id-WHC mass tal-hamrija
– 9 sa – 12	Thejjija tal-koltura tal- <i>F. candida</i> sinkronika
– 2 sa – 7	Hamrija mxarrba minn qabel
– 1	Qassam iż-żgħar flottijiet Hejji s-soluzzjonijiet ewlenin u applika s-sustanza kimika tat-test jekk hemm bżonn ta' solvent
0	Hejji s-soluzzjonijiet ewlenin u applika s-sustanza kimika tat-test jekk hija sustanza kimika solida, tinhall fl-ilma jew hemm bżonn ta' applikazzjoni fuq il-wiċċ. Kejjel il-pH tal-hamrija u iżen il-kontenituri. Žid l-ikel. Dahhal il-kollembolani.
14	Test ta' sejbien tal-medda tal- <i>F. fimetaria</i> : Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-hamrija u t-telf ta' ilma (piż) Testijiet definittivi: Kejjel il-kontenut tal-umdità u erġ'imla l-ilma u žid 2-10 mg hmira
21	Test definittiv tal- <i>F. fimetaria</i> : Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-hamrija u t-telf ta' ilma (piż) Sejbien tal-medda tal- <i>F. candida</i> : Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-hamrija u t-telf ta' ilma (piż)
28	Test definittiv tal- <i>F. candida</i> : Temm it-test, estratta l-annimali, kejjel il-pH tal-hamrija u t-telf ta' ilma (piż)

▼ M6

Appendiċi 3

Gwida dwar it-trobbija u s-sinkronizzazzjoni ta' *F. fimetaria* u *F. candida*

Iż-żmien u d-durati mogħtijin f'din il-gwida għandhom jiġu vverifikati għal kull razza ta' kollembolani speċifiċi sabiex jiġi żgurat li t-twaqqit ikun biżżejjed għal żgħar sinkronizzati biżżejjed. Bażikament, l-inċidenza tal-ovipożizzjoni wara li l-adulti jiġu ttrasferiti għal substrat frisk u t-tifqis tal-bajd jiddetermina l-jum xieraq għall-għbir tal-bajd u l-għbir ta' żgħar sinkroniċi.

Huwa rrakkomandat li wiehed ikollu koltura permanenti ta' stokk li tikkonsisti f', eż., 50 kontenitur/dixx Petri. Il-koltura tal-istokk għandha tinżamm f'kundizzjoni tajba ta' tmigh permezz ta' tmigh, tisqija u tneħħija ta' ikel u karkassi qodma. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed kollembolani fis-substrat jista' jkun hemm inibizzjoni minhabba tkabbir fungali msahħaħ. Jekk il-koltura tal-istokk tintuża spiss wisq għall-produzzjoni tal-bajd, il-koltura tista' tgheja. Sinjali ta' gheja huma adulti mejtjn u moffa fuq is-substrat. Il-bajd li jifdal mill-produzzjoni ta' annimali sinkroniċi jistgħu jintużaw biex tiġgedded il-koltura.

F'koltura sinkronika tal-*F. fimetaria*, issir distinzjoni bejn l-irġiel u n-nisa, primarjament skont id-daqs. L-irġiel huma ferm iżgħar min-nisa, u l-irġiel jimxu b'rata iktar mgħaġġla min-nisa. L-għażla korretta tas-sess ftit li xejn tehtieg Prattika u tista' tiġi kkonfermata bi spezzjoni mikroskopika taż-żona ġenitali (13).

1. Trobbija**1.a. Thejjija tas-substrat tal-koltura**

Is-substrat tal-koltura huwa materjal tal-kisi ta' Pariġi (sulfat tal-kalċju) b'karbonju attiv. Dan jipprovi substrat niedi, bil-funzjoni li l-karbonju jassorbi gassijiet ta' skart u eskreti (14) (15). Jistgħu jintużaw forom differenti ta' karbonju biex jiġu ffaċilitati osservazzjonijiet tal-Kollembola. Perezempju, jintuża karbonju mithuna għal *F. candida* u *F. fimetaria* (li jipproduċi materjal tal-kisi iswed/griż ta' Pariġi):

Kostitwenti tas-substrat:

- 20 ml karbonju attiv
- 200 ml ilma distillat
- 200 ml materjal tal-kisi ta' Pariġi

jew

- 50 g karbonju mithun attiv
- 260-300 ml ta' ilma distillat
- 400 g materjal tal-kisi ta' Pariġi.

It-tahlita tas-substrat titħalla toqghod qabel tintuża.

1.b. Tgħammir

Il-kollembolani jinżammu f'kontenituri bħal dixxijiet Petri (90 mm × 13 mm), bil-qiegh miksi b'saff ta' 0,5 cm substrat tal-karbonju/ materjal tal-kisi. Huma kkulturati f'20 ± 1 °C f'ċiklu ta' dawl-dlam ta' 12-12-il siegħa (400-800 Lux). Il-kontenituri jridu jinżammu mxarrbin il-hin kollu billi jiġi żgurat li l-umdità tal-arja fi hdan il-kontenituri tkun ta' 100 %. Dan jista' jiġi ggarantit bil-preżenza ta' ilma hieles fi hdan il-materjal tal-kisi poruż, iżda tiġi evitata l-ġenerazzjoni ta' rita tal-ilma fuq wiċċ il-materjal tal-kisi. It-telf

▼ M6

ta' ilma jista' jiġi evitat billi tiġi pprovduta arja ambjentali umda. Kwalunkwe individwu mejjet għandu jitneħħa mill-kontenituri, kif ukoll kwalunkwe ikel immuffat. Biex tiġi stimolata l-produzzjoni ta' bajd, hemm bżonn li l-annimali adulti jitqiegħdu f'dixxijiet Petri b'materjal tal-kisi ta' Parigi ppreparat ġdid/substrat tal-karbonju.

1.c. *Sors tal-ikel*

Tintuża hmira mnixxa u mithuna tal-furnar bħala l-unika provvista ta' ikel kemm għal *F. candida* kif ukoll *F. fimetaria*. Ikel frisk jiġi pprovdut darba jew darbtejn fil-ġimgħa, sabiex tiġi evitata l-moffa. Jitqiegħed eżatt fuq il-materjal tal-kisi ta' Parigi f'munzell żgħir. Il-massa tal-hmira tal-furnar miżjuda għandha tiġi aġġustata għad-daqs tal-popolazzjoni tal-kollembolani, iżda bħala regola generali 2-15-il mg huma biżżejjed.

2. **Sinkronizzazzjoni**

It-test għandu jsir b'annimali sinkronizzati sabiex jinkisbu annimali tat-test omoġeni tal-istess instar u daqs. Barra minn hekk, is-sinkronizzazzjoni tippermetti d-diskriminazzjoni tal-*F. fimetaria* rġiel u nisa mill-età ta' 3 ġimgħat 'il quddiem fuq il-bażi ta' dimorfizmu sesswali, jiġifieri differenzi fid-daqs. Il-proċedura ta' hawn taht hija suġġeriment fuq kif jinkisbu annimali sinkronizzati (l-istadji prattiċi mhumieħ obbligatorji).

2.a. *Sinkronizzazzjoni.*

- Hejji l-kontenituri b'saff ta' 0,5 cm ta' materjal tal-kisi ta' Parigi/substrat tal-karbonju.
- Meta jiġu biex ibidu, ittrasferixxi 150-200 *F. fimetaria* adult u 50-100 *F. candida* mill-aħjar 15-20 kontenitur tal-kultura tal-istokk b'substrat ta' 4-8 ġimgħat għall-kontenituri u itmagħhom 15-il mg hmira tal-furnar. Evita milli tinkludi liż-żgħar flimkien mal-adulti peress li l-preżenza taż-żgħar tista' tinibixxi l-produzzjoni tal-bajd.
- Żomm il-kultura f' 20 ± 1 °C (il-medja għandha tkun ta' 20 °C) u ċiklu ta' dawl-dlam ta' 12-12-il siegħa (400-800 Lux). Ara li jkun hemm ikel frisk disponibbli u l-arja hija saturata bl-ilma. Nuqqas ta' ikel jista' jwassal sabiex l-annimali jneħħu l-hmieg fuq il-bajd, u dan jirriżulta fi tkabbir fungali fuq il-bajd jew inkella l-*F. candida* jistgħu jikkannibalizzaw il-bajd tagħhom stess. Wara 10 ijiem, il-bajd jingabar bir-reqqa b'labra u spatula u jitqiegħed f'"karti tal-bajd" (biċċiet żgħar ta' karta filtru mxappa fil-materjal tal-kisi ta' Parigi/sospensjoni magħquda tal-karbonju) li jitqiegħdu f'kontenitur b'substrat ta' materjal tal-kisi frisk/-substrat tal-karbonju). Jizdiedu ftit hbu tal-hmira mas-substrat sabiex jiġu attirati z-żgħar u jkollhom jitolqu mill-karti tal-bajd. Importanti li l-karti tal-bajd u s-substrat jibqgħu umdi, jew inkella l-bajd jiġi deidratat. Inkella, l-annimali adulti jistgħu jitneħħew mill-kaxxa tal-kultura tas-sinkronizzazzjoni wara li jipproduċu l-bajd għal jumejn jew tlieta.
- Wara tliet ijiem, hafna mill-bajd fuq il-karti tal-bajd ser ikun faqqas, u whud miż-żgħar jistgħu jispiċċaw taht il-karti tal-bajd.
- Biex ikun hemm żgħar b'età ndaqs, il-karti tal-bajd b'bajd li ma faqqasx jitneħħew mid-dixx Petri bil-forċipi. Iz-żgħar, issa 0-3 ijiem, jibqgħu fid-dixx u jintemgħu hmira tal-furnar. Il-bajd li ma jfaqqasx jintrema.
- Il-bajd u z-żgħar li faqqsu jiġu kkulturati bl-istess mod bħall-adulti. B'mod partikolari għall-*F. fimetaria*, għandhom jittieħdu l-miżuri li ġejjin: żgur li jkun hemm biżżejjed ikel frisk, jitneħħa l-ikel qadim li qed jimmoffa, wara ġimgħa z-żgħar jitqassmu f'dixxijiet Petri godda diment li d-densità tkun ta' iktar minn 200.

▼ **M6**2.b. *Ġestjoni tal-kollembolani fil-bidu tat-test*

- *F. candida* b'età ta' 9-12-il jum jew il-*F. fimetaria* b'età ta' 23-26 jum jingabru, eż. b'irdigh, u jinhelsu f'kontenitur żgħir b'materjal tal-kisi mxarrab/substrat tal-karbonju u l-kundizzjoni fiżika tagħhom tiġi vverifikata taht il-mikroskopju binokulari (annimali li korrew u li wegġgħu jittnehhew). Il-passi kollha għandhom jittiehdu filwaqt li l-kollembolani jinżammu f'atmosfera niedja biex jiġi evitat stress minn nixfa, eż. billi jintużaw uċuħ imxarrbin eċċ.
- Dawwar il-kontenitur minn fuq għal isfel u taptap fuqu biex tittrasferixxi l-kollembolani fil-hamrija. Elettriku statiku għandu jiġi newtralizzat, inkella l-annimali jaf jaqbd u jtiru fl-arja, jew jehlu mal-ġenb tal-kontenitur tat-test u jinxfu. Għal newtralizzazzjoni jistgħu jintużaw jonizzatur jew biċċa niedja taht il-kontenitur.
- L-ikel għandu jitferrex fuq il-wiċċ kollu tal-hamrija u mhux biss f'munzell wiehed.
- Matul it-trasportar u matul il-perjodu ta' ttestjar, għandhom jiġu evitati daqqiet jew disturb fiżiku ieħor fuq il-kontenituri tat-test, peress li dan jista' jżid l-kompattar tal-hamrija, u jxekkel l-interazzjoni bejn il-kollembolani.

3. **Speċijiet ta' Kollembolani alternattivi**

Jistgħu jinghażlu speċijiet ta' kollembolani oħrajn għall-ittestjar skont dan il-metodu ta' ttestjar bħal *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. L-ewwel iridu jiġu ssodisfati numru ta' prerekwiziti qabel ma jintużaw speċijiet alternattivi:

- Għandhom jiġu identifikati bla ekwivoki;
- Għandha tiġi spjegata l-motivazzjoni wara l-għażla tal-ispeċijiet;
- Għandu jiġi żgurat li l-bijoloġika riproduttiva tkun inkluża fil-fażi tal-ittestjar sabiex tkun mira potenzjali matul l-espożizzjoni;
- Il-ġrajja għandha tkun magħrufa: l-età tal-maturità, id-durata tal-iżvilupp tal-bajd, u l-instars soġġetti għal espożizzjoni;
- Il-kundizzjonijiet ottimali għat-tkabbir u r-riproduzzjoni għandhom jiġu pprovduti mis-substrat tat-test u l-provvista tal-ikel;
- Il-varjabbiltà għandha tkun baxxa biżżejjed biex tinhareġ stima preċiża u eżatta tat-tossicità.

▼ **M6***Appendiċi 4***Estrazzjoni u għadd tal-annimali****1. Jistghu jintużaw żewġ metodi ta' estrazzjoni.**

1.a. L-ewwel metodu: Jista' jintuża estrattur tal-gradjent bit-temperatura kkontrollata bbażat fuq il-prinċipji minn MacFadyen (1). Is-shana li ġejja minn element tat-tishin fil-quċċata tal-kaxxa ta' estrazzjoni (irregolata minn termistur imqiegħed fuq wiċċ il-kampjun tal-hamrija). It-temperatura fil-likwidu mkessah madwar ir-reċipjent miġbur huwa rregolat permezz ta' termistur li jinsab fil-wiċċ tal-kaxxa tal-ġbir (imqiegħda taht il-qalba tal-hamrija). It-termisturi huma mqabbdin ma' unità ta' kontroll programmabbli li jzid it-temperatura skont skeda pprogrammata minn qabel. L-annimali jingabru fil-kaxxa ta' ġbir imkessha (2 °C) b'saff tal-qiegħ tal-materjal tal-kisi ta' Pariġi/karbonju. L-estraxxjoni tinbeda f'25 °C u t-temperatura tiżdied b'5 °C b'mod awtomatiku kull 12-il siegħa u għandha durata totali ta' 48 siegħa. Wara 12-il siegħa f'40 °C l-estraxxjoni tkun lesta.

1.b. It-tieni metodu: Wara l-perjodu ta' inkubazzjoni sperimentali, in-numru ta' Kollembola zġhar jiġi vvalutat biż-żamma fil-wiċċ. Għal dan il-ghan, it-test isir fir-reċipjenti b'volum ta' bejn wieħed u iehor 250 ml. Fi tmiem it-test, jiddahhal 200 ml ilma distillat. Il-hamrija tithawwad bilmod b'pinzell fin biex il-Kollembola jkunu jistghu jzommu f'wiċċ l-ilma. Jista' jizdied ammont zġhir, madwar 0,5 ml, ta' kolorant fotografiku Kentmere mal-ilma biex jgħin fl-għadd billi jzid il-kuntrast bejn l-ilma u l-Kollembola bojod. Il-kolorant mhuwiex tossiku għall-Kollembola.

2. L-għadd:

L-għadd tal-kwantità jista' jsir bl-għajnejn jew taht mikroskopju ħafif bl-użu ta' grilja mqiegħda fuq ir-reċipjent taż-żamma fil-wiċċ jew permezz ta' ritratt tal-wiċċ ta' kull reċipjent u billi wara jingħaddu l-Kollembola fuq ritratti stampati kbar jew slides tal-projettur. L-għadd jista' jsir ukoll bl-użu ta' tekniki ta' pproċessar ta' immaġnijiet diġitali (12). It-tekniki kollha għandhom jiġu vvalidati.

▼ **M6***Appendiċi 5***Determinazzjoni tad-WHC massima tal-hamrija**

Instab li l-metodu li ġej sabiex tiġi stabbilita l-kapjenza massima tal-ilma (WHC) tal-hamrija huwa xieraq. Huwa deskritt fl-Anness C tal-ISO DIS 11268-2 (Kwalità tal-Hamrija — Effetti tas-sustanzi niġġiesa fuq il-hniex (*Eisenia fetida*). Parti 2: Determinazzjoni tal-effetti fuq ir-riproduzzjoni).

Iġbor kwantità definita (eż. 5 g) tas-substrat tal-hamrija tat-test billi tuża apparat tal-kampjunar xieraq (tubu trapan eċċ.). Għatti qiegħ it-tubu b'biċċa mxarrba ta' karta filtru u mbagħad qiegħdu fuq xtiliera f'banjumarija. It-tubu għandu jitghaddas b'mod gradwali sakemm il-livell tal-ilma jkun fuq wiċċ il-hamrija. Imbagħad għandu jithalla fl-ilma għal madwar tliet s'ghat. Peress li mhux l-ilma kollu assorbit mill-kapillari tal-hamrija jista' jinżamm, il-kampjun tal-hamrija għandu jithalla jibbattal għal perjodu ta' sagħtejn billi t-tubu jitqiegħed fuq medda ramel kwarzuz mithun fin u mxarrab hafna li jinsab f'reċipjent mġhotti (biex jiġi evitat tnixxif). Imbagħad, il-kampjun għandu jintiżen, imnixxef għal massa kostanti f'105 °C. Il-kapjenza tal-ilma (WHC) għandha tiġi kkalkolata kif ġej:

$$\text{WHC (f'\% ta' massa niexfa)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Fejn:

S = sottostrat saturat bl-ilma + massa tat-tubu + massa tal-karta filtru

T = ġulbiena (massa tat-tubu + massa tal-karta filtru)

D = massa niexfa ta' substrat

▼ M6*Appendiċi 6***Determinazzjoni tal-pH tal-hamrija**

Il-metodu li ġej sabiex tiġi stabbilita l-pH ta' hamrija huwa bbażat fuq id-deskrizzjoni mogħtija fl-ISO DIS 10390: Kwalità tal-Hamrija — Stabbiliment tal-pH.

Kwantità ddefinita ta' hamrija titnixxef f'temperatura tal-kamra għal tal-inqas 12-il siegħa. Imbagħad issir sospensjoni tal-hamrija (li fiha tal-inqas 5 grammi ta' hamrija) f'hames darbiet il-volum tagħha ta' soluzzjoni ta' 1 M ta' klorur tal-potassju ta' grad analitiku (KCl) jew soluzzjoni ta' 0,01 M ta' klorur tal-kalcju ta' grad analitiku (CaCl_2). Is-sospensjoni mbagħad tithallat sew għal hames minuti u mbagħad tithalla toqghod għal tal-inqas sagħtejn iżda mhux għal iktar minn 24 siegħa. Imbagħad il-pH tal-fażi likwida titkejjel bl-użu ta' metru tal-pH li ġie kkalibrat qabel kull kejl bl-użu ta' sensiela xieraq ta' soluzzjonijiet ta' bafer (eż. pH 4,0 u 7,0).

▼ M6

C.40. TEST TAT-TOSSIČITÀ TAČ-ĊIKLU TAL-HAJJA TAL-KIRONOMIDI F'ILMA TAN-NAQAL BL-UŻU TA' ILMA MIŻJUD JEW NAQAL MIŻJUD

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Itestjar (TG) 233 (2010) tal-OECD. Tfassal sabiex jiġu vvalutati l-effetti tal-espożizzjoni tul il-hajja tas-sustanzi kimiċi fuq id-ditteru tal-ilma helu *Chironomus* sp., billi jkopri bis-shih l-ewwel generazzjoni (generazzjoni P) u l-parti bikrija tat-tieni generazzjoni (generazzjoni F1). Huwa estensjoni tal-metodi ta' ttestjar eżistenti C.28 (1) jew C.27 (15) bl-użu ta' xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma miżjud jew xenarju tan-naqal miżjud, rispettivament. Jiehu f'kunsiderazzjoni l-protokolli eżistenti dwar l-itestjar tat-tossiċità għal *Chironomus riparius* u *Chironomus dilutus* (qabel imsejhin *C. tentans* (2)) li ġew żviluppati fl-Ewropa u l-Amerika ta' Fuq (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) u li mbagħad sarilhom ringtest (1) (7) (10) (11) (12). Jistgħu jintużaw speċijiet kironomidi oħrajn iddokumentati sew, eż. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Id-durata shiha tal-espożizzjoni hija ta' madwar 44 jum għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, u —madwar 100 jum għal *C. dilutus*.
2. Kemm ix-xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma kif ukoll dak tan-naqal huma deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar. L-ghazla ta' xenarju ta' espożizzjoni xieraq jiddependi mill-applikazzjoni mahsuba tat-test. Ix-xenarju ta' espożizzjoni tal-ilma, b'żieda mal-kolonna tal-ilma, huwa mahsub sabiex jistimola avveniment ta' deriva sprejjata tal-pestiċidi u jkopri l-konċentrazzjoni massima inizjali fl-ilmijiet tal-wiċċ. Iz-żieda mal-ilma hija siewja wkoll għal tipi oħrajn ta' espożizzjoni (inkluż it-tixrid ta' sustanzi kimiċi), iżda mhux għal proċessi ta' akkumulazzjoni fi hdan in-naqal li jdum iktar mill-perjodu tat-test. F'dak il-każ, u anki meta l-iskol ikun ir-rotta ewlenija ta' dħul ewlenija tal-pestiċidi fil-korpi tal-ilma, disinn ta' naqal miżjud jista' jkun iktar xieraq. Jekk ikun hemm xenarji ta' espożizzjoni oħrajn ta' interess, id-disinn tat-test jista' jiġi adattat malajr. Pereżempju, jekk id-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn il-faži tal-ilma u s-saff tan-naqal ma tkunx ta' interess u l-assorbiment fin-naqal irid jiġi minimizzat, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tan-naqal artifiċjali surrogat (eż. ramel kwarżuż).
3. Sustanzi kimiċi li jehtiegu testijiet ta' organiżmi li jghixu fin-naqal jistgħu jibqgħu fin-naqal tul perjodi twal. L-organiżmi li jghixu fin-naqal jistgħu jiġu esposti għal għadd ta' rotot. L-importanza relattiva ta' kull rotta ta' espożizzjoni, u ż-żmien meħud għal kull waħda sabiex tikkontribwixxi għall-effett tossiku globali, tiddependi mill-karatteristiċi fizikokimiċi tas-sustanza kimika. Għal sustanzi kimiċi b'assorbiment qawwi jew għal sustanzi kimiċi b'rabta kovalenti man-naqal, l-iġestjoni ta' ikel ikkontaminat jista' jkun rotta ta' espożizzjoni importanti. Sabiex ma tiġix sottovalutata t-tossiċità ta' sustanzi kimiċi ferm lipofiliċi, jista' jiġi kkunsidrat l-użu tal-ikel imdahhal fin-naqal qabel tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 31). Għalhekk, huwa possibbli li jiġu inklużi r-rotot kollha ta' espożizzjoni u l-istadji kollha tal-hajja.
4. Il-punti ta' tmiem imkejlin huma n-numru totali ta' adulti li jfeġġu (kemm għall-1 generazzjoni kif ukoll għat-2), ir-rata ta' żvilupp (kemm għall-1 generazzjoni kif ukoll għat-2), il-proporzjon tas-sessi tal-adulti li feġġew bis-shih u hajjin (kemm għall-1 generazzjoni kif ukoll għat-2), in-numru tač-ċwiemi bajd għal kull mara (l-ewwel generazzjoni biss) u l-fertilità tač-ċwiemi bajd (l-ewwel generazzjoni biss).
5. Huwa ferm rakkomandat naqal ifformulat. Naqal ifformulat għandu bosta vantaġġi fuq naqal naturali:

▼ M6

- il-varjabbiltà sperimentali titnaqqas għaliex tagħmel parti minn “matriċi standardizzati” riproduttivi u titneħħa l-ħtieġa li jinkiseb naqal nadif mhux ikkontaminat;
- it-testijiet jistgħu jinbnew fi kwalunkwe ħin mingħajr ma jkun hemm varjabbiltà stagjonali fin-naqal tat-test u ma hemm ebda bżonn ta' pretrattament tan-naqal biex titneħħa fawna indigena;
- inqas spejjeż meta mqabbel mal-ġbir fuq il-post ta' biżżejjed kwantitajiet għal testijiet ta' rutina;
- in-naqal ifformulat jippermetti li jsiru paraguni tat-tossicità bejn l-istudji u l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi kif xieraq (3).

6. Id-definizzjonijiet użati jingħataw fl-Appendiċi 1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. L-ewwel larva kironomidi instar huma esposti għal medda ta' konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'sistema tal-ilma tan-naqal. It-test jibda billi titqiegħed l-ewwel larva instar (l-ewwel ġenerazzjoni) fil-bekkijiet tat-test li fihom naqal miżjud jew inkella s-sustanza kimika tat-test tiġi miżjuda fl-ilma wara li tiddaħħal il-larva. Jiġu vvalutati l-emergenza kironomida, iż-żmien sal-feġġa u l-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin. L-adulti li feġġew huma ttrasferiti f'gaġeġ tat-tgħammir, biex jiġi ttrasmisur u ttrasmisur u l-ovipozizzjoni. Jiġu vvalutati n-numru ta' ċwiemi bajd prodotti u l-fertilità tagħhom. Minn dawn iċ-ċwiemi bajd, jinkisbu l-ewwel larva instar tat-tieni ġenerazzjoni. Dawn il-larva jitqiegħdu f'bekkijiet tat-test ippreparati għodda (il-proċedura ta' zieda bħal dik għall-1 ġenerazzjoni) sabiex tiġi stabbilita l-vijabbiltà tat-2 ġenerazzjoni permezz ta' valutazzjoni tal-feġġa tagħhom, iż-żmien għall-feġġa u l-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u ħajjin (preżentazzjoni skematika tat-test taċ-ċiklu tal-hajja hija pprovduta fl-Appendiċi 5). Id-dejta kollha tiġi analizzata jew permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkaguna tnaqqis ta' X % fil-punt ta' tmiem rilevanti, jew bl-użu ta' ttestjar tal-ipoteżi sabiex tiġi stabbilita Konċentrazzjoni Mingħajr Effetti Osservabbli (NOEC). Din tal-aħħar teħtieġ paragun tar-risponsi għat-trattament bir-risponsi ta' kontroll xierqa bl-użu ta' testijiet statistiċi. Ta' min jinnota li fix-xenarju tal-ilma miżjud, fil-każ ta' sustanzi kimiċi b'degradazzjoni veloċi, l-istadji tal-hajja aħħarin ta' kull ġenerazzjoni (eż. il-fażi ta' pupa) jistgħu jkunu esposti għal livell ta' konċentrazzjoni konsiderevolment inqas fl-ilma tal-madwar milli fl-ewwel larva instar. Jekk dan huwa ta' tħassib, u hemm bżonn ta' livell ta' espożizzjoni paragonabbli għal kull stadju tal-hajja, jistgħu jiġu kkunsidrati l-emendi li ġejjin tal-metodu ta' ttestjar:

- serje parallela b'żidiet fi stadji differenti tal-hajja, jew
- żidiet ripetuti (jew tiġdid tal-ilma tal-madwar) tas-sistema tat-test matul iż-żewġ fażijiet ta' ttestjar (l-ewwel u t-tieni ġenerazzjonijiet), filwaqt li l-intervalli taż-żidiet (tiġdid) għandhom jiġu aġġustati għall-karatteristiċi tal-eżitu tas-sustanza kimika tat-test.

It-tali emendi huma fattibbli biss fix-xenarju tal-ilma miżjud, izda mhux fix-xenarju bin-naqal miżjud.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

8. Is-solubilità tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar u l-log K_{ow} tagħha, għandha tkun magħrufa l-partizzjoni mkejla jew ikkalkolata fin-naqal u l-istabbiltà fl-ilma u n-naqal. Għandu jkun hemm disponibbli metodu analitiku affidabbli biex tiġi kkwantifikata s-sustanza kimika tat-test fl-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal bi preċiżjoni

▼ **M6**

u limitu ta' detezzjoni maghrufin u rrapportati. Informazzjoni siewja tink-ludi l-formula strutturali u l-purità tas-sustanza kimika tat-test. L-eżitu kimiku tas-sustanza kimika tat-test (eż. dissipazzjoni, degradazzjoni abijotika u bijotika, eċċ.) huwa siewi wkoll. F'(16) hija pprovduta gwida ulterjuri għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi bi karatteristiċi fizikokimiċi li jagħmluhilhom diffiċli biex isirilhom it-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

9. Is-sustanzi kimiċi ta' referenza jistgħu jiġu ttestjati b'mod perijodiku bħala mezz sabiex jiġi żgurat li s-sensittività tal-popolazzjoni tal-laboratorju ma nbidlitx. Bħal bid-dafnidi, biżżejjed li jsir test akut fuq 48 siegħa (skont 17). Madankollu, sakemm ikun hemm linja gwida akuta vvalidata disponibbli, jista' jiġi kkunsidrat test skont il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness. Eżempji ta' tossikanti ta' referenza użati b'suċċess fir-ringtests u studji ta' validazzjoni huma: lindan, trifluralin, pentaklorofenol, klorur tal-kadmju u klorur tal-potassju. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITÀ TAT-TEST

10. Sabiex it-test ikun validu, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

- il-feġġa medja fit-trattament tal-kontroll għandha tkun tal-inqas 70 % fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni għaž-żewġ generazzjonijiet (1) (7);
- għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*, 85 % tal-insetti adulti totali li feġġew mit-trattament tal-kontroll fiż-żewġ generazzjonijiet għandha ssehh bejn il-jum 12 u 23 wara t-tidhirl tal-ewwel larva instar fir-reċipjenti; għal *C. dilutus*, huwa aċċettabbli perjodu ta' 20 sa 65 jum;
- il-proporzjon medju tas-sessi tal-adulti li feġġew kompletament u haġġin (bħala frazzjoni ta' nisa jew irġiel) fit-trattament tal-kontroll taż-żewġ generazzjonijiet għandu jkun tal-inqas 0,4, iżda ma jaqbiżx iż-0,6;
- għal kull gaġġa tat-tgħammir, in-numru ta' ċwiemi bajd fil-kontrolli tal-ewwel generazzjoni għandu jkun tal-inqas 0,6 għal kull mara miżjuda fil-gaġġa tat-tgħammir;
- il-frazzjoni taċ-ċwiemi bajd fertili f'kull gaġġa tat-tgħammir tal-kontrolli tal-ewwel generazzjoni għandha tkun tal-inqas 0,6;
- fi tmiem il-perjodu ta' espożizzjoni għaž-żewġ generazzjonijiet, il-pH u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandhom jitkejl f'kull reċipjenti. Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu għandha tkun tal-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV ⁽¹⁾), u l-pH tal-ilma tal-madwar għandu jkun bejn 6 u 9 fir-reċipjenti tat-test kollha;
- it-temperatura tal-ilma ma għandhiex tvarja b'aktar minn $\pm 1,0$ °C.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Reċipjenti tat-test u gaġġ tat-tgħammir**

11. Il-larva hija esposta f'bekki tal-ħġieġ ta' 600 ml b'dijametru ta' madwar 8,5 cm (ara l-Appendiċi 5). Reċipjenti oħrajn huma xierqa, iżda għandhom jiggarrantixxu fond tal-ilma tal-madwar u n-naqal. Il-wiċċ tan-naqal għandu jkun biżżejjed sabiex jingħataw 2 sa 3 cm² għal kull larva. Il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal għall-fond tal-ilma tal-madwar

⁽¹⁾ F'20 °C taht pressjoni atmosferika standard, l-ASV fl-ilma helu huwa ta' 9,1 mg/l (60 % isarraf f'5,46 mg/l)

▼ M6

għandu jkun ta' madwar 1:4. Bħala minimu għandhom jintużaw gaġeġ tat-tgħammir (tal-inqas 30 cm fit-tliet dimensjonijiet kollha kemm huma) b'xibka tal-wajer (daqs tax-malja madwar 1 mm) fin-naha ta' fuq u fil-ġenb tal-gaġġa (ara l-Appendiċi 5). F'kull gaġġa jitqiegħed dixx kristallizzanti ta' 2 l, li fih ilma u naqal tat-test, għal ovipożizzjoni. Anki għad-dixx kristallizzanti, il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal għall-fond tal-ilma tal-madwar għandu jkun ta' madwar 1:4. Wara li ċ-ċwiemi bajd jingabru mid-dixx kristallizzanti, jitqiegħdu fi platt mikrotiter bi 12-il toqba (ċima waħda għal kull toqba li fiha tal-inqas 2,5 ml ilma mid-dixx kristallizzanti miżjud) u wara dan il-platti jitgħattew b'għatu biex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Jistgħu jintużaw ukoll reċipjenti oħrajn xierqa sabiex jinżammu ċ-ċwiemi bajd. Bl-eċċezzjoni tal-platti tal-mikrotiter, ir-reċipjenti kollha tat-test u l-apparati kollha l-oħrajn li ser jidhlu f'kontatt mas-sistema ta' ttestjar għandhom ikunu magħmulin kompletament mill-ħġieġ jew materjal kimikament interi iehor (eż. Politetrafluoroetilen).

Għażla tal-ispeċijiet

12. Idealment, l-ispeċi li għandha tintuża fit-test hija *Chironomus riparius*. Tista' tintuża *C. yoshimatsui*. Tista' tintuża *C. dilutus* ukoll iżda diffiċli timmaniġġjaha u tehtieg perjodu ta' ttestjar itwal. Id-dettalji dwar il-metodi tal-koltura jingħataw fl-Appendiċi 2 għal *C. riparius*. Hemm informazzjoni dwar il-kundizzjonijiet tal-koltura disponibbli għal *C. dilutus* (5) u *C. yoshimatsui* (14). L-identifikazzjoni tal-ispeċi għanda tiġi kkonfermata qabel l-ittestjar iżda mhijiex mehtieġa qabel kull test jekk l-organizmi jkunu ġejjin minn koltura meħuda mil-laboratorju stess.

Naqal

13. Idealment għandu jintuża naqal ifformulat (imsejjah ukoll naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku). Madankollu, jekk jintuża naqal naturali, dan għandu jkun ikkaratterizzat (tal-inqas il-pH, il-kontenut ta' karbonju organiku, l-istabbiliment ta' parametri oħrajn bħall-proporzjon C/N u l-granulometrija huma rrakkomandati wkoll) u għandu jkun hieles minn kwalunkwe kontaminazzjoni u organizmu iehor li jista' jikkompeti mal-larva kironomida jew jikkonsmaha. Qabel l-ittestjar huwa rrakkomandat ukoll li n-naqal jiġi kkondizzjonat għal sebat ijiem fil-kundizzjonijiet tat-test. In-naqal ifformulat li ġej, kif deskritt f(1), huwa rrakkomandat (1) (20) (21):
 - a. 4-5 % pit (piż xott): qrib pH 5,5 sa 6,0 kemm jista' jkun; importanti li jintuża pit f'forma ta' trab, mithun fin (daqs tal-partikoli ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja biss;
 - b. 20 % tafal tal-kawlina (piż xott) (idealment il-kontenut tal-kawlina jkun iktar minn 30 %);
 - c. 75-76 % ramel kwarzuż (piż xott) (ir-ramel fin għandu jkun predominanti b'iktar minn 50 fil-mija tal-partikoli bejn 50 u 200 μ m);
 - d. Jiddaħhal ilma dejonizzat sabiex tinkiseb umdità tat-tahlita finali fil-medda ta' 30–50 %;
 - e. Il-karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura (CaCO_3) jiżdied sabiex tiġi aġġustata l-pH tat-tahlita finali tan-naqal għal $7,0 \pm 0,5$;
 - f. Il-kontenut tal-karbonju organiku tat-tahlita finali għandu jkun ta' 2 % ($\pm 0,5$ %) u jrid jiġi aġġustat billi jintużaw l-ammonti xierqa ta' pit u ramel, skont (a) u (c).
14. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina u r-ramel għandu jkun magħruf. Il-komponenti tan-naqal għandhom jiġu kkontrollati sabiex jiġi żgurat li

▼ **M6**

ma hemmx kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti tal-orga-nokloru, komposti organofosforużi). Eżempju għat-thejji tan-naqal iffr-mulat huwa deskritt fl-Appendiċi 3. It-tahlit tal-kostitwenti nixfin huwa aċċettabbli wkoll jekk jintwera li wara ż-żieda tal-ilma tal-madwar ma ssehhx separazzjoni tal-kostitwenti tan-naqal (eż. partikoli tal-pit li jżommu fil-wiċċ), u li l-pit jew in-naqal huwa kkondizzjonat biżżejjed.

Ilma

15. Kwalunkwe ilma li jikkonforma mal-karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli kif elenkat fl-Appendiċijiet 2 u 4 huwa xieraq bħala ilma tat-test. Kwalunkwe ilma xieraq, ilma naturali (ilma tal-wiċċ jew ta' taht l-art), ilma rikostitwit (ara l-Appendiċi 2) jew ilma tal-vit deklorat huma aċċettabbli bħala ilma tal-kultura u ilma tat-test, jekk il-kironomidi jgħixu fih mingħajr ma juru sinjali ta' stress sakemm jitlestew il-kultura u t-testijiet. Fil-bidu tat-test, il-pH tal-ilma tat-test għandha tkun ta' bejn 6 u 9 u l-ebusija totali mhijiex ikbar minn 400 mg/l bħala CaCO_3 . Madankollu, jekk hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija u s-sustanza kimika tat-test, għandu jintuża l-ilma tal-ebusija inferjuri (u b'hekk, f'din is-sitwazzjoni ma għandux jintuża l-Elendt Medium M4). L-istess tip ta' ilma għandu jintuża tul l-istudju kollu. Il-karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma elenkati fl-Appendiċi 4 għandhom jitkejlu tal-inqas darbtejn fis-sena jew meta jkun hemm suspett li dawn il-karatteristiċi setghu nbidlu hafna.

Soluzzjonijiet ewlenin — Ilma miżjud

16. a. Il-konċentrazzjonijiet tat-test huma kkalkolati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet tal-kolonna tal-ilma, jiġifieri l-ilma ta' fuq in-naqal. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżulin normalment jithejjew b'dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Idealment is-soluzzjonijiet ewlenin jithejjew billi tiġi dissolta s-sustanza kimika tat-test fl-ilma tat-test. L-użu ta' solventi jew dispersivi jista' jkun mehtiegħ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Eżempji ta' solventi xierqa huma aċetun, etilen glikol monoetil eter, etilen glikol dimetileter, dimetilformamid u trietilen glikol. Id-dispersivi li jistghu jintużaw huma Cremophor RH40, Tween 80, metilċelluloża 0,01 % u HCO-40. Il-konċentrazzjoni tal-aġent solubilizzanti fil-midjum tat-test finali għandha tkun minima (jiġifieri $\leq 0,1$ ml/l) u għandha tkun l-istess fit-trattamenti kollha. Meta jintuża aġent solubilizzanti, ma għandu jkollu ebda effett importanti fuq is-sopravivenza kif muri minn kontroll bis-solvent meta mqabbel ma' kontroll negattiv (bl-ilma). Madankollu, għandu jsir kull sforz sabiex jiġi evitat l-użu tat-tali materjali.

Soluzzjonijiet ewlenin — Naqal miżjud

16. b. In-naqal miżjud fil-konċentrazzjoni magħżula normalment jithejja billi tiżdied soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test direttament fin-naqal. Soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test dissolta filma dejonizzat tithallat man-naqal ifformulat mithna ta' rrumblar, hallat tal-ġhalf jew tahlit bl-idejn. Jekk ftit li xejn tinhall fl-ilma, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi dissolta f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku xieraq (eż. essan, aċetun jew kloroformi). Imbagħad is-soluzzjoni tithallat ma' 10 g ramel kwarżuż fin għal kull reċipjent tat-test. Is-solvent jithalla jevapora u għandu jitneħħa kompletament mir-ramel; imbagħad ir-ramel jithallat mal-ammont xieraq tan-naqal. Jistghu jintużaw biss aġenti li jivvolatilizzaw malajr sabiex iħollu, jifirxu jew jemulsifikaw is-sustanza kimika tat-test. Ta' min ifakkar li r-ramel ipprovdut mis-sustanza kimika tat-test u t-tahlita ta' ramel għandu jittiehed f'kunsiderazzjoni meta jithejja

▼ **M6**

n-naqal (jiġifieri, b'hekk, in-naqal għandu jithejja b'inqas ramel). Għandha tinghata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda man-naqal hija mifruxa u mqassma sew fin-naqal. Jekk hemm bżonn, is-subkampjuni jistgħu jiġu analizzati sabiex jiġi stabbilit il-grad ta' omoġenità.

DISINN TAT-TEST

17. Id-disinn tat-test huwa marbut mal-ghażla tan-numru u l-ispazjar tal-konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' reċipjenti f'kull konċentrazzjoni, in-numru ta' larva għal kull reċipjent, in-numru ta' dixxijiet kristallizzanti u l-gaġġ tat-tgħammir. Id-disinji għall-EC_x, NOEC u test tal-limitu huma deskritti hawn taht.

Disinn għall-analizi b'rigressjoni

18. Il-konċentrazzjoni effettiva (EC_x) u l-medda tal-konċentrazzjoni li huwa ta' interess l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuqha, għandha tkun ikkalibrata mit-test, b'tali mod li l-punt ta' tmiem ma jiġix estrapolat barra l-konfini tad-dejta ġġenerata. Għandha tiġi evitata estrapolazzjoni ferm inqas mill-inqas jew oghla mill-oghla konċentrazzjoni. Test preliminari tas-sejbien tal-medda skont il-Metodi ta' Ttestjar C.27 jew C.28 jista' jkun siewi meta tiġi biex tingħażel medda xierqa tal-konċentrazzjonijiet tat-test.

19. Għal approċċ tal-EC_x, huma mehtieġa tal-inqas hames konċentrazzjonijiet u tmien irreprikati għal kull konċentrazzjoni. Għal kull konċentrazzjoni għandhom jintużaw żewġ gaġġ tat-tgħammir (A u B). It-tmien irreprikati jinqasmu f'żewġ gruppi ta' erba' rreprikati biex iservu kull gaġġ tat-tgħammir. Dan it-tagħqid tal-irreprikati huwa mehtieġ minhabba n-numru ta' insetti mehtieġa fil-gaġġ għall-valutazzjonijiet tar-riproduzzjoni tal-hsejjes. Madankollu, it-tieni generazzjoni għandha tmien irreprikati wkoll, li l-ewwel bdew fil-popolazzjonijiet esposti fil-gaġġ tat-tgħammir. Il-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn (tista' ssir eċċezzjoni f'każijiet li fihom il-kurva ta' doża — rispons ikollha inklinazzjoni grafika baxxa). In-numru ta' rreprikati f'kull trattament jista' jitnaqqas sa sitta (tlieta f'kull gaġġ tat-tgħammir) jekk jiżdied in-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test b'risponsi differenti. Iz-żieda tan-numru ta' rreprikati jew it-tnaqqis tad-daqs tal-intervalli tal-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom tendenza li jwasslu għal intervalli ta' kunfidenza iqsar madwar l-EC_x.

Disinn għall-istima ta' NOEC

20. Għal approċċ tal-NOEC, għandhom jintużaw hames konċentrazzjonijiet tat-test b'tal-inqas tmien irreprikati (4 għal kull gaġġ tat-tgħammir, A u B) u l-fattur bejn il-konċentrazzjonijiet ma għandux ikun ikbar minn tnejn. In-numru ta' rreprikati għandu jkun biżżejjed sabiex tiġi żgurata sahha statistika adegwata sabiex tinstab differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikanza ta' 5 % ($\alpha = 0,05$). Għar-rata tal-iżvilupp, il-fekondità u l-fertilità, normalment xieraq li ssir analizi tal-varjana (ANOVA), segwita minn test ta' Tunnnett jew ta' Williams (22-25). Għall-proporzjon tal-fegġa u l-proporzjon tas-sessi, it-test ta' Cochran-Armitage, it-test eżatt ta' Fisher (bil-korrezzjoni Bonferroni), jew it-test Mantel-Haentz jistgħu jkun xierqa.

Test tal-limitu

21. Jista' jsir test tal-limitu (konċentrazzjoni wahda tat-test u kontroll(i)) jekk ma jiġu osservati ebda effetti fit-test preliminari fakultattiv ta' sejbien tal-medda sa konċentrazzjoni massima. L-iskop tat-test tal-limitu huwa li jindika li nstab xi effett tossiku tas-sustanza kimika f'livelli oghla mill-konċentrazzjoni limitu ttestjata. Huwa ssuġġerit li għall-ilma jintużaw 100 mg/l u għan-naqal 1 000 mg/kg (piż xott). Normalment, ikun hemm bżonn

▼ M6

ta' minimu ta' tmien irreplikati kemm għat-trattament kif ukoll għall-kontroll. Għandha tintwera sahha statistika adegwata biex tinstab differenza ta' 20 % mill-kontroll fil-livell ta' sinifikanza ta' 5 % ($\alpha = 0,05$). B'risponsi metriċi (eż. rata tal-iżvilupp), it-test-t huwa metodu statistiku xieraq jekk id-dejta tissodisfa r-reqwiziti ta' dan it-test (normalità, varjanzi omoġeni). Jista' jintuża test-t tal-varjanza mingħajr ekwivoku jew test mhux parametrik, bħat-test ta' Wilcoxon-Mann-Whitney, jekk ma jkunux issodisfati dawn ir-reqwiziti. Bil-proporzjon tal-feġġa, xieraq li jintuża t-test eżatt ta' Fisher.

PROCEDURA

Kundizzjonijiet tal-espożizzjoni*Thejjiġa tas-sistema tal-ilma-naqal (ilma miżjud)*

22. a. Naqal ifformulat (ara l-paragrafi 13-14 u l-Appendiċi 3) jiddaħhal f'kull reċipjent tat-test u dixx kristallizzanti sabiex jiġi f'format saff ta' tal-inqas 1,5 cm (għad-dixx kristallizzanti jista' jkun kemxejn inqas) iżda mhux iktar minn 3 cm. L-ilma (ara l-paragrafu 15) jiżdied sabiex il-proporzjon tal-fond tas-saff tan-naqal u l-fond tal-ilma ma jaqbiżx il-1:4. Wara li jithejjew ir-reċipjenti tat-test, is-sistema tan-naqal-ilma għandha tithalla tiehu arja hafifa għal madwar sebat ijiem qabel ma tiddaħhal l-ewwel larva instar tal-ewwel jew it-tieni ġenerazzjoni (ara l-paragrafu 14 u l-Appendiċi 3). Is-sistema tan-naqal-ilma tad-dixxijiet kristallizzanti ma tinghatax arja matul it-test, peress li dawn ma għandhomx bżonn isostnu s-sopravivenza tal-larva (qabel ma jfaqqsu ċ-ċwiemi bajd diġà miġburin). Sabiex tiġi evitata separazzjoni tal-ingredjenti tan-naqal u s-sospensjoni mill-ġdid tal-materjal fin matul iż-żieda tal-ilma tat-test fil-kolonna tal-ilma, in-naqal jista' jitgħatta b'diska tal-plastik filwaqt li jittferra' l-ilma fiha. Id-diska titneħħa eżatt wara. Jistgħu jintużaw apparati xierqa oħrajn.

Thejjiġa tas-sistema ta' ilma-naqal (naqal miżjud)

22. b. Kull naqal miżjud imhejji skont il-paragrafu 16b jitqiegħed fir-reċipjent u dixx kristallizzanti u jittferra' l-ilma tal-madwar sabiex jiġi prodott proporzjon tal-volum tan-naqal-ilma ta' 1:4. Il-fond tas-saff tan-naqal għandu jvarja bejn 1,5 sa 3 cm (jista' jkun kemxejn inqas għad-dixx kristallizzanti). Sabiex tiġi evitata separazzjoni tal-ingredjenti tan-naqal u s-sospensjoni mill-ġdid tal-materjal fin meta jittferra' l-ilma fil-kolonna tal-ilma, in-naqal jista' jitgħatta b'diska tal-plastik meta jkun qed jittferra' l-ilma, u d-diska titneħħa għal kollox wara. Jistgħu jintużaw apparati xierqa oħrajn. Ladarba jithejja n-naqal miżjud bl-ilma tal-madwar, idealment tkun tista' ssir partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test min-naqal għall-fażi milwiema (4) (5) (7) (18). Idealment dan għandu jsir fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u tal-arja użati fit-test. Iż-żmien għall-ekwilibrazzjoni xierqa huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanza kimika, u jista' jvarja bejn sigħat sa jiem u f'każijiet rari sa hames ġimgħat. Peress li sa dan iż-żmien hafna sustanzi kimiċi jibdeu jiddegradaw, m'hemmx bżonn li wiehed jistenna ekwilibriju, iżda huwa rrakkomandat perijodu ta' 48 siegħa għall-ekwilibrazzjoni. Madankollu, meta n-nofs haġja tad-degradazzjoni tas-sustanza kimika fin-naqal ikun magħruf bħala wiehed twil (ara l-paragrafu 8), il-hin għall-ekwilibrazzjoni jista' jiġi estiż. Fi tmiem dan il-perijodu mtawwal għall-ekwilibrazzjoni, għandha titkejjel il-koncentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjoni u wahda inqas (ara l-paragrafu 38). Dawn id-determinazzjonijiet analitiċi tas-sustanzi kimiċi tat-test jippermettu sabiex jiġi kkalkolat il-bilanċ tal-massa u jinħarġu r-riżultati fuq il-bażi tal-koncentrazzjonijiet imkejjlin.

23. Ir-reċipjenti tat-test għandhom jitgħattew (eż. bi platti tal-ħġieġ). Jekk hemm bżonn, matul l-istudju jista' jiżdied l-ilma biex ipatti għall-evaporazzjoni bil-ghan li jerga' jintlaħaq il-volum originali. Dan għandu jsir bl-użu ta' ilma distillat jew dejonizzat sabiex tiġi evitata kwalunkwe akkumulazzjoni ta' melh. Id-dixxijiet kristallizzanti fil-gaġeġ tat-tgħammir

▼ M6

mhumieq mgħottjin u jistgħu, iżda mhux bilfors, jiġu aġġustati sabiex ipattu għat-telf tal-ilma matul il-perjodu tat-test, peress li ċ-ċwimi bajd jidhlu f'kontatt mal-ilma għal madwar jum wiehed biss u d-dixxijiet jintużaw biss għal perjodu qasir tat-test.

Tidhila tal-organizmi tat-test

24. Erba' sa hamest ijiem qabel ma tiddaħhal l-ewwel larva għall-ewwel ġenerazzjoni, il-mases tal-bajd għandhom jittiehdu mill-kultura u jitqiegħdu f'reċipjenti żgħar f'midjum tal-kultura. Jista' jintuża midjum antik mill-kultura tal-istokk jew inkella midjum imhejji ġdid. Xorta wahda dejjem għandu jiżdied ammont żgħir ta' ikel, eż. ftit taqtiriet ta' filtrat minn sospensjoni mithuna sew ta' għalf tal-hut imsaffaf, mal-midjum tal-kultura (ara l-Appendiċi 2). Għandhom jintużaw biss mases ta' bajd frisk. Is-soltu, il-larva tibda taqqas ftit tal-jiem wara li l-adulti jbidu (jumejn sa 3 ijiem għal *C. riparius* f'20 °C u bejn jum u erbgha għal *C. dilutus* at 23 °C u *C. yoshimatsui* f'25 °C) u t-tkabbir tal-larva jsehh f'erba' instars, b'kull wiehed b'durata ta' bejn 4 u 8 ijiem. Fit-test għandu jintuża l-ewwel larva instar (massimu ta' 48 siegħa wara t-tifqis). L-istadju instar tal-larva jista' jiġi vverifikat billi tintuża l-wisgħa tal-kapsula tar-ras (7).
25. L-ewwel għoxrin larva instar għall-ewwel ġenerazzjoni jiġu allokati għal għarrieda għal kull reċipjent tat-test li fih is-sistema ta' naqal-ilma, bl-użu ta' pipetta bil-ponta. L-ilma ma jibqax jingħata l-arja meta tkun qed tiddaħhal il-larva fir-reċipjenti tat-test u dan għandu jibqa' jsehh għal 24 siegħa wara li tiddaħhal il-larva (ara l-paragrafu 32). Skont id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), in-numru ta' larva użata għal kull konċentrazzjoni huwa tal-inqas 120 (6 irreplikati għal kull konċentrazzjoni) għall-approċċ tal-EC_x u 160 għall-approċċ tal-NOEC (8 irreplikati għal kull konċentrazzjoni). Fid-disinn tan-naqal miżjud, l-espożizzjoni tibda billi tiddaħhal il-larva.

Ilma tal-madwar miżjud

26. Erbgha u għoxrin siegħa wara li tiddaħhal l-ewwel larva instar għall-ewwel ġenerazzjoni, is-sustanza kimika tat-test tiżdied fil-kolonna tal-ilma tal-madwar, u terġa' tingħata ftit arja (għal emendi possibbli fid-disinn tat-test, ara l-paragrafu 7). Jiġu applikati volumi żgħar tas-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma bl-użu ta' pipetta. Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jithawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Fid-disinn tal-ilma miżjud, l-espożizzjoni tibda biz-zieda fl-ilma (jiġifieri jum wara li tiddaħhal il-larva).

Għir tal-adulti li feġġew

27. L-insetti li feġġew tal-ewwel ġenerazzjoni jingħabru tal-inqas darba, iżda idealment darbtejn kuljum (ara l-punt 36) mir-reċipjenti tat-test bl-użu ta' aspiratur, eżawrient jew apparat simili (ara l-Appendiċi 5). Għandha tingħata attenzjoni speċjali sabiex l-adulti ma jgħarrbux griehi. L-insetti migħburin mill-erba' reċipjenti tat-test fi hdan trattament wiehed jinħelsu f'gaġġa tat-tgħammir li kienu ġew assenjati fiha. Fil-jum tal-ewwel feġġa (ta' raġel), id-dixxijiet kristallizzanti jiżdiedu permezz ta' pipetta b'volum żgħir tas-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma (id-disinn tal-ilma miżjud). Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jithawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Nominalment, il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fid-dixx kristallizzanti hija l-istess bħal fir-reċipjenti tat-trattament li huma assenjati għal dik il-gaġġa

▼ M6

tat-tgħammir speċifika. Għad-disinn tan-naqal miżjud, id-dixxijiet kristallizzanti huma mhejjijin f'madwar il-jum 11 wara l-bidu tal-espożizzjoni (jiġifieri t-tidhli tal-larva tal-ewwel generazzjoni) sabiex ikunu jistgħu jekwilibrar għal madwar 48 siegħa qabel jiġu prodotti l-ewwel ċwiemi bajd.

28. L-ċwiemi bajd jingabru mid-dixx kristallizzanti fil-gaġġa tat-tgħammir bl-użu ta' pinzetti jew pipetta bil-ponta. Kull ċima bajd titqiegħed f'reċipjent li fih midjum tal-koltura mid-dixx kristallizzanti li ngabret minnu (eż. toqba ta' mikroplatt bi 12-il toqba flimkien ma' tal-inqas 2,5 ml midjum). Ir-reċipjenti biċ-ċwiemi bajd huma mgħottjin b'għatu sabiex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. L-ċwiemi tal-bajd jinżammu taħt osservazzjoni għal tal-inqas sitt ijiem wara li jkunu ġew prodotti sabiex ikunu jistgħu jiġu kklassifikati bħala fertili jew infertili.

Għall-bidu tat-tieni generazzjoni, tal-inqas tlieta iżda idealment sitt ċwiemi bajd fertili jingħazlu minn kull gaġġa tat-tgħammir u flimkien ma' xi ikel jithejjew ifaqqsu. Dawn iċ-ċwiemi bajd ġew prodotti fl-eqgħel żmien ta' ovipożizzjoni, li normalment isehh madwar il-jum 19 tat-test fil-kontrolli. Idealment, it-tieni generazzjoni tat-trattamenti kollha tinbeda dakinhar stess, iżda minhabba l-effetti relatati mas-sustanza kimika fuq l-iżvilupp tal-larva, dan mhux dejjem ikun possibbli. F'każ bhal dan, il-koncentrazzjonijiet oġġa jistgħu jinbdew iktar tard meta mqabblin mat-trattamenti inqas u l-kontroll (bis-solvent).

29. a. Fid-disinn tal-ilma miżjud, is-sistema tan-naqal-ilma għat-tieni generazzjoni tithejja billi tizdied is-sustanza kimika tat-test fil-kolonna tal-ilma tal-madwar madwar siegħa qabel tiddaħħal l-ewwel larva instar fir-reċipjenti tat-test. Jiġu applikati volumi żgħir tas-soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test taħt wiċċ l-ilma bl-użu ta' pipetta. Imbagħad l-ilma tal-madwar għandu jithawwad bil-galbu sabiex in-naqal ma jkunx iddisturbat. Wara z-zieda, tingħata ftiit arja.

29. b. Fid-disinn tan-naqal miżjud, ir-reċipjenti ta' espożizzjoni li fihom is-sistema tan-naqal-ilma għat-tieni generazzjoni jithejjew bl-istess mod bħall-ewwel generazzjoni.

30. L-ewwel ghoxrin larva instar (mhux iktar minn 48 siegħa wara t-tifqis) tat-tieni generazzjoni jiġu allokati għall-gharrieda għal kull reċipjent tat-test li fih is-sistema ta' naqal-ilma miżjuda, bl-użu ta' pipetta bil-ponta. L-ilma ma għandux jibqa' jingħata arja filwaqt li tiddaħħal l-ewwel larva instar fir-reċipjenti tat-test u dan għandu jibqa' jsehh għal 24 siegħa oħra wara li tiddaħħal il-larva. Skont id-disinn tat-test użat (ara l-paragrafi 19 u 20), in-numru ta' larva użata għal kull koncentrazzjoni huwa tal-inqas 120 (6 irreplikati għal kull koncentrazzjoni) għall-approċċ tal-EC_x u 160 għall-approċċ tal-NOEC (8 irreplikati għal kull koncentrazzjoni).

Ikel

31. Hemm bżonn li l-larva jingħataw għalt fir-reċipjenti tat-test, idealment kuljum jew tal-inqas tliet darbiet fil-ġimgħa. 0,25 — 0,5 mg (0,35 — 0,5 mg għal C. yoshimatsui) għalf għall-hut (sospensjoni fl-ilma jew ikel mithun fin, eż. Tetra-Min jew Tetra-Phyll; ara d-dettalji fl-Appendiċi 2) għal kull larva kull jum huwa ammont adegwat ta' ikel għal larva żgħira matul l-ewwel għaxart ijiem tal-iżvilupp tagħhom. Larva ikbar tista' tkun teħtieġ ftiit iktar ikel: 0,5 — 1,0 mg għal kull larva kull jum għandu jkun biżżejjed għall-bqija tat-test. Il-porzjon tal-ikel għandha titnaqqas fit-trattamenti kollha u l-kontroll jekk jiġi osservat tkabbir fungali jew jekk tiġi osservata mortalità fil-kontrolli. Jekk l-iżvilupp fungali ma jkunx jista' jittwaqqaf, it-test għandu jiġi rripetut.

Ir-relevanza tossikoloġika tal-espożizzjoni permezz ta' ingestjoni generalment tkun ikbar f'sustanzi kimiċi b'affinità għolja għal karbonju organiku

▼ M6

jew sustanzi kimiċi b'rabta kovalenti man-naqal. B'hekk, meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi b'dawn il-karatteristiċi, l-ammont ta' ikel meħtieġ sabiex jiġu żġurati sopravivenza u tkabbir naturali tal-larva jista' jizdied man-naqal ifformulat qabel il-perjodu ta' stabilizzazzjoni, skont id-domanda regolatorja. Sabiex jiġi evitat milli titgharraq il-kwalità tal-ilma, għandu jintuża materjal tal-pjanti minflok għalf għall-ħut, eż. zieda ta' 0,5 % (piż xott) weraq mithunin fini ta' hurrieq (*Urtica dioica*), ċawsli (*Morus alba*), xnien abjad (*Trifolium repens*), spinaċi (*Spinacia oleracea*) jew materjal ieħor tal-pjanti (*Cerophyl* jew *α*-ċelluloża). L-ghoti tal-proporzjon shiħ ta' sors tal-ikel organiku fin-naqal qabel iż-żieda mhuwiex trivjali fir-rigward tal-kwalità tal-ilma u l-prestazzjoni bijoloġika (21), u lanqas metodu standardizzat, iżda studji riċenti jagħtu indikazzjonijiet li dan il-metodu jahdem (19) (26). Normalment, l-insetti adulti fil-gaġġa tat-tgħammir ma jeħtieġu ebda tmigh, iżda l-fekondità u l-fertilità jissahhu meta tajjara mxarba f'soluzzjoni tas-sukrożju saturat tiġi offruta bħala sors tal-ikel għal adulti li feġġew (34).

Kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni

32. L-ghoti ta' ftiit arja lill-ilma tal-madwar fir-reċipjenti tat-test isir 24 siegħa wara li tiddaħhal l-ewwel larva instar taż-żewġ ġenerazzjonijiet u jkompli jseħħ matul it-test shiħ (għandha tinghata attenzjoni li l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt ma taqax taht is-60 % tal-ASV). Tinghata l-arja permezz ta' pipetta Pasteur tal-ħġieġ li l-iżbokk tagħha huwa fiss 2-3 cm 'il fuq mis-saff tan-naqal u tagħti ftiit b'żewġ/sek. Meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi volatili, għandha tinghata kunsiderazzjoni sabiex ma tinghatax arja lis-sistema ta' naqal-ilma, filwaqt li fl-istess hin għandu jiġi ssodisfat il-kriterju ta' validità tal-ASV minimu ta' 60 % (paragrafu 10). Tinghata gwida ulterjuri f'(16).
33. It-test b'*C. riparius* isir f'temperatura kostanti ta' 20°C (± 2 °C). Għal *C. dilutus* u *C. yoshimatsui*, it-temperaturi rrakkomandati huma 23 °C u 25 °C (± 2 °C), rispettivament. Jintuża fotoperjodu ta' 16-il siegħa u l-intensità tad-dawl għandha tkun ta' 500 sa 1 000 lux. Għall-gaġġa tat-tgħammir tista' tiġi inkluża fażi ta' siegħa addizzjonali taż-żerniq u raxx id-dlam.

Durata tal-espożizzjoni

34. Disinn tal-ilma miżjud: Il-perjodu ta' espożizzjoni tal-ewwel ġenerazzjoni jibda meta l-oġġett tat-test jiżdied fl-ilma fir-reċipjenti tat-test (li jsir jum wara t-tidh il-tal-larva — għal emendi possibbli tad-disinn tal-espożizzjoni, ara l-paragrafu 7). L-espożizzjoni tat-tieni ġenerazzjoni tal-larva tibda minnufih, peress li tiddaħhal f'sistema tan-naqal-ilma li diġà ġiet miżjuda. Id-durata massima tal-espożizzjoni għall-ewwel ġenerazzjoni hija ta' 27 jum u għat-tieni ġenerazzjoni 28 jum (il-larva tal-ewwel ġenerazzjoni tqatta' jum fir-reċipjenti bla espożizzjoni) għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui*. Fid-dawl tas-sovrappożizzjoni, id-durata shiħa tat-test hija ta' madwar 44 jum. Għal *C. dilutus*, id-durati massimi tal-espożizzjoni huma ta' 64 u 65 jum, għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni, rispettivament. Id-durata totali hija ta' madwar 100 jum.

Disinn tan-naqal miżjud: l-espożizzjoni tibda billi tiddaħhal il-larva u hija ta' massimu ta' 28 jum għaž-żewġ ġenerazzjonijiet għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui* u massimu ta' 65 jum għaž-żewġ ġenerazzjonijiet għal *C. dilutus*.

Osservazzjonijiet

Emergenza

35. Iz-zmien tal-iżvilupp u n-numru totali tal-insetti rgħiel u nisa hajjin u li feġġew kompletament jiġu stabbiliti għaž-żewġ ġenerazzjonijiet. L-irgħiel faċli jiġu identifikati mill-antenni piluži u l-ġisem irqiq tagħhom.

▼ M6

36. Ir-reċipjenti tat-test taż-żewġ generazzjonijiet għandhom jiġu osservati tal-inqas tliet darbet fil-ġimgha biex issir valutazzjoni viżwali ta' kwalunkwe mġiba anormali tal-larva (eż. jitolqu min-naqal, għawm mhux bhas-soltu), meta mqabbla mal-kontroll. Matul il-perjodu tal-feġġa, li jibda madwar 12-il jum wara t-tidhli tal-larva għal *C. riparius* u *C. yoshimatsui* (wara 20 jum għal *C. dilutus*), l-insetti li jfeġġu jingħaddu u jitqassmu skont is-sess tal-inqas darba, iżda idealment darbtejn kuljum (kmieni filgħodu u tard waranofshinar). Wara li jiġu identifikati, l-insetti tal-ewwel generazzjoni jitnehhew bil-galbu mir-reċipjenti u jiġu ttrasferiti f'gagġa tat-tgħammir. Insetti tat-tieni generazzjoni jitnehhew u jinqatlu wara li jiġu identifikati. Kwalunkwe ċima bajd iddepożitata fir-reċipjenti tat-test tal-ewwel generazzjoni għandha tingabar għaliha u tiġi ttrasferita ma' tal-inqas 2,5 ml ilma nattiv f'mikroplatti bi 12-il toqba (jew reċipjenti xierqa oħrajn) li jitgħattew b'għatu sabiex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. In-numru ta' larva mejta u pupi viżibbli li naqsu milli jfeġġu għandu jiġi rreġistrat ukoll. Eżempji ta' gagġa tat-tgħammir, reċipjent tat-test u eżawrient huma pprovduti fl-Appendiċi 5.

Riproduzzjoni

37. L-effetti fuq ir-riproduzzjoni huma vvalutati permezz tan-numru ta' ċwiemi bajd prodotti mill-ewwel generazzjoni ta' insetti u l-fertilità ta' dawn iċ-ċwiemi bajd. Iċ-ċwiemi bajd jingabru darba kuljum mid-dixx kristallizzanti li jitqiegħed f'kull kontenitur tat-tgħammir. Iċ-ċwiemi bajd għandhom jingabru u jiġu ttrasferiti ma' tal-inqas 2,5 ml ilma nattiv f'mikroplatt bi 12-il toqba (ċima bajd waħda f'kull toqba) jew reċipjenti xierqa oħrajn, li jitgħattew b'għatu biex tiġi evitata evaporazzjoni sinifikanti. Il-karatteristiċi li ġejjin huma ddokumentati għal kull ċima bajd: jum il-produzzjoni, daqs (normali, jiġifieri $1,0 \pm 0,3$ cm jew żgħar; tipikament $\leq 0,5$ cm), u struttura (normali = forma ta' banana bi spaga bajd fi spiral jew anormali, eż. spaga bajd mhux fi spiral) u l-fertilità (fertili jew infertili). Matul is-sitt ijiem wara li tiġi prodotta, tiġi vvalutata l-fertilità ta' ċima bajd. Ċima bajd titqies fertili meta jfaqqsu tal-inqas terz mill-bajd. In-numru totali ta' nisa mdahhlin fil-gagġa tat-tgħammir jintuza sabiex jiġi kkalkolat in-numru ta' ċwiemi bajd għal kull mara u n-numru ta' ċwiemi bajd fertili għal ull mara. Jekk ikun hemm bżonn, in-numru ta' bajd f'ċima bajd jista' jiġi stmat mingħajr qirda bl-użu tal-metodu ta' għadd taċ-ċrieki (spjegat fi 32 u 33).

Kejliet analitiċi*Konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test*

38. Bħala minimu, il-kampjuni tal-ilma tal-madwar, l-ilma tal-pori u n-naqal għandhom jiġu analizzati fil-bidu tal-espożizzjoni (fil-każ ta' ilma miżjud, idealment siegħa wara l-applikazzjoni) u fi tmiem it-test, fl-ogħla konċentrazzjoni u waħda inqas. Dan japplika għal reċipjenti miż-żewġ generazzjonijiet. Mid-dixxijiet kristallizzanti fil-gagġa tat-tgħammir jiġi analizzat l-ilma tal-madwar biss, peress li dan huwa ma' xiex jidhlu f'kuntatt iċ-ċwiemi bajd (għad-disinn tan-naqal miżjud, tista' tiġi kkunsidrata konferma analitika tal-konċentrazzjoni tan-naqal). Jistgħu jsiru kejliet oħrajn tan-naqal, l-ilma tal-pori jew l-ilma tal-madwar matul it-test, jekk dawn jitqiesu neċessarji. Dawn id-determinazzjonijiet tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jipprovdu informazzjoni dwar l-imġiba/il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-sistema tal-ilma-naqal. Il-kampjunar tan-naqal u l-ilma tal-pori fil-bidu u matul it-test (ara l-paragrafu 39) jehtieg reċipjenti addizzjonali tat-test sabiex isiru determinazzjonijiet analitiċi. Il-kejliet fin-naqal fid-disinn tal-ilma miżjud jaf ma jkunux

▼ **M6**

mehtieġa jekk il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn l-ilma u n-naqal tkun iddeterminata biċ-ċar fi studju tal-ilma/naqal f'kundizzjonijiet paragunabbli (eż. proporzjon tan-naqal għall-ilma, it-tip ta' applikazzjoni, il-kontenut ta' karbonju organiku tan-naqal), jew jekk jintwera li l-konċentrazzjonijiet imkejlin fl-ilma tal-madwar jibqgħu fi hdan it-80 sa 120 % tal-konċentrazzjonijiet inizjali nominali jew imkejlin.

39. Meta jsiru kejljet intermedji (eż. fil-jum 7 u/jew 14) u jekk l-analiżi tehtiġ kampjuni kbar li ma jistgħux jittiehdu mir-reċipjenti tat-test bla ma tiġi influwenzata s-sistema tat-test, għandhom isiru determinazzjonijiet analitiċi fuq kampjuni minn reċipjenti addizzjonali tat-test ittrattati bl-istess mod (inkluża l-preżenza tal-organizmi tat-test) iżda mhux użati għal osservazzjonijiet bijoloġiċi.
40. Ċentrifugazzjoni, eż., b'10 000 g f'4 °C għal 30 min hija l-proċedura rrakkomandata biex jiġi iżolat ilma interstizjali (= tal-pori). Madankollu, jekk jintwera li s-sustanza kimika tat-test ma tassorbix filtri, tista' tkun aċċettata filtrazzjoni wkoll. F'ċerti każijiet, jaf ma jkunx possibbli li jiġu analizzati konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori peress li l-volum tal-kampjun jista' jkun żgħir wisq.

Parametri fiżikokimiċi

41. Il-pH, l-ossigenu dissolt fl-ilma tat-test u t-temperatura tal-ilma fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti għandhom jitkelju kif xieraq (ara l-paragrafu 10). L-ebusija u l-ammonijaka għandhom jitkelju fil-kontrolli u freċċipjent tat-test wieħed u f'dixx kristallizzanti fl-ogħla konċentrazzjoni fil-bidu u fi tmiem it-test.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

42. L-iskop ta' dan it-test taċ-ċiklu tal-hajja huwa li jiġi stabbilit l-effett tas-sustanza kimika tat-test fuq ir-riproduzzjoni u, għal żewġ ġenerazzjonijiet, ir-rata tal-iżvilupp u n-numru totali tal-insetti rġiel u nisa hajjin u li feġġew kompletament. Għad-dejta dwar il-proporzjon tal-feġġa, l-irġiel u n-nisa għandhom jiġu raggruppati. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn is-sensitivitajiet fir-rata tal-iżvilupp tas-sessi separati, ir-riżultati tal-irġiel u n-nisa jistgħu jitgħaqqu flimkien għal analiżi statistika.
43. Il-konċentrazzjonijiet effettivi mogħtijin bhala konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-madwar (għal ilma miżjud) jew fin-naqal (għal naqal miżjud), normalment jiġu kkalkolati fuq il-bażi tal-konċentrazzjonijiet imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni (ara l-paragrafu 38). Għalhekk, għal ilma miżjud, tinstab il-medja għal kull trattament tal-konċentrazzjonijiet tipikament imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni fl-ilma tal-madwar tar-reċipjenti għaž-żewġ ġenerazzjonijiet u daww tad-dixxijiet kristallizzanti. Għal naqal miżjud, tinstab il-medja għal kull trattament tal-konċentrazzjonijiet tipikament imkejlin fil-bidu tal-espożizzjoni fir-reċipjenti għaž-żewġ ġenerazzjonijiet (u daww tad-dixxijiet kristallizzanti, iżda mhux bilfors).
44. Biex tiġi kkalkolata stima ta' punt, jiġifieri EC_x , jistgħu jintużaw l-istatistiki għal kull reċipjent u kull gaġġa tat-tgħammir bhala rreplikati veri. Fil-kalkolu ta' intervall tal-kunfidenza għal kwalunkwe EC_x , għandu jingħata kont lill-varjabbiltà bejn ir-reċipjenti, jew inkella għandu jintwera li din il-varjabbiltà tant hija żgħira li tista' ma tagħtix kasha. Meta l-mudell jiġi adattat skont l-Inqas Kaxex, għandha tiġi applikata trasformazzjoni għall-istatistiki għal kull reċipjent sabiex titjeb l-omoġenità tal-varjanza. Madankollu, il-valuri tal- EC_x għandhom jiġu kkalkolati wara li r-rispons jiġi trasformat lura lejn il-valur oriġinali (31).

▼ M6

45. Meta l-analizi statistika jkollha l-għan li tiddetermina l-NOEC permezz ta' ttestjar tal-ipotezi, irid jinghata kont lill-varjabbiltà bejn ir-reċipjenti, u dan huwa ggarantit bl-użu tal-metodi ANOVA (eż. il-proċeduri tat-test ta' Williams u Dunnett). It-test ta' Williams ikun xiraq meta fit-teorija jkun mistenni rispons-doża monotoniku u t-test ta' Dunnett ikun xieraq meta ma tkunx valida l-ipotezi tal-monotonicità. Inkella, jistgħu jkun xierqa testijiet iktar robusti (27) f'sitwazzjonijiet li fihom ikun hemm ksur tas-suppożizzjonijiet normali tal-ANOVA (31).

Proporzjon tal-feġġa

46. Il-proporzjonijiet tal-feġġa huma dejta kwantali, u jistgħu jiġu analizzati bit-test rigressiv Cochran-Armitage meta jkun mistenni doża-rispons monotoniku u din id-dejta tkun konsistenti ma' din l-aspettattiva. Jekk le, jista' jintuża test eżatt ta' Fisher jew Mantel-Haentzel b'valuri-p aġġustati ta' Bonferroni-Holm. Jekk hemm evidenza ta' varjabbiltà ikbar bejn l-irreplikati fi hdan l-istess konċentrazzjoni milli tindika distribuzzjoni binomjali (spiss imsejha bħala varjazzjoni "extrabinomjali", f'dak il-każ għandu jintuża test eżatt ta' Fisher jew Cochran-Armitage robust bħal kif propost f'(27).

Is-somma tal-insetti hajjin (irġiel u nisa f'daqqa) li feġġew għal kull reċipjent, n_e , hija stabbilita u maqsuma bin-numru ta' larva mdahhla, n_a :

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

fejn:

ER = proporzjon tal-feġġa

n_e = in-numru ta' insetti hajjin li feġġew għal kull reċipjent

n_a = in-numru ta' larva mdahhla għal kull reċipjent (normalment 20)

Meta n_e jkun ikbar minn n_a (jiġifieri meta jkun ikbar b'mod imprevist min-numru previst ta' larva mdahhla) n_a għandu jkun ekwivalenti għal n_e .

47. *Approċċ ieħor li huwa l-iktar xieraq għal daqsijiet ta' kampjuni kbar, meta jkun hemm varjanza binomjali żejda, huwa li l-proporzjon tal-feġġa jiġi ttrattat bħala rispons kontinwu u jintużaw proċeduri konsistenti ma' din id-dejta dwar l-ER.* Daqs ta' kampjun kbir hawnhekk huwa ddefinit bħala n-numru ta' insetti li feġġew u n-numru li ma feġġewx li t-tnejn li huma jaqbu l-hamsa, fuq bażi għal kull irreplikati (għal kull reċipjent).
48. Sabiex jiġu applikati l-metodi ANOVA, l-ewwel il-valuri tal-ER iridu jiġu ttrasformati mit-trasformazzjoni tal-għerq kwadrat tal-arksin jew it-trasformazzjoni Tukey-Freeman sabiex tinkiseb distribuzzjoni approssimata normali u biex jiġu ekwalizzati l-varjanzi. Jista' jiġi applikat it-test ta' Cochran-Armitage, it-test eżatt ta' Fisher (Bonferroni), jew it-test ta' Mantel-Haentzel meta jintużaw il-frekwenzi assoluti. It-trasformazzjoni tal-għerq kwadrat tal-arksin hija applikata billi jittiehed is-sine invers ($\sin^{-1}$) tal-għerq u kwadrat tal-ER.
49. Għal proporzjonijiet tal-feġġa, il-valuri EC_x huma kkalkolati bl-użu ta' analizi tar-rigressjoni (eż. mudelli probit, logit jew Weibull (28)). Jekk l-analizi tar-rigressjoni ma tirnexxiex (eż. meta jkun hemm inqas minn żewġ risponsi parzjali), jistgħu jintużaw metodi mhux paramettriċi oħrajn bħall-medja f'każ li jkun interpolazzjoni sempliċi.

Rata tal-iżvilupp

50. Iż-żmien medju tal-iżvilupp jirrappreżenta l-medda medja ta' żmien bejn it-tidh tal-larva (jum 0 tat-test) u l-feġġa tal-koorta sperimentali ta' insetti

▼ **M6**

(għall-kalkolu taż-żmien propju tal-iżvilupp, għandha tiġi kkunsidrata l-età tal-larva fi żmien it-tidhil). Ir-rata tal-iżvilupp (unità: 1/jum) hija r-reċiproku taż-żmien tal-iżvilupp u tirrappreżenta dak il-porzjon tal-iżvilupp tal-larva li jsehh kull jum. Ir-rata tal-iżvilupp hija ppreferuta għall-evalwazzjoni ta' dawn l-istudji dwar it-tossicità tan-naqal u l-varjanza tagħha huwa inqas, u hija iktar omogenea u eqreb distribuzzjoni normali meta mqabbla maż-żmien tal-iżvilupp. B'hekk, jistgħu jintużaw proċeduri tat-test parametrik u iktar b'saħħithom bir-rata tal-iżvilupp għall-kontrarju taż-żmien tal-iżvilupp. Għar-rata tal-iżvilupp bħala rispons kontinwu, EC_{x-} il-valuri jistgħu jiġu stmati b'analizi tar-rigressjoni (eż. (29) (30)). NOEC għar-rata medja tal-iżvilupp jista' jiġi stabbilit permezz tal-metodi ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett. Peress li l-irġiel ifegġu iktar malajr min-nisa, jiġifieri għandhom rata tal-iżvilupp oghla, jagħmel sens li tiġi kkalkolata r-rata tal-iżvilupp għal kull sess b'mod separat minbarra dik għall-insetti totali.

51. Għall-ittestjar statistiku, huwa supponut li n-numru ta' insetti osservati fil-jum ta' spezzjoni x feġġ fil-medja tal-intervall ta' żmien bejn il-jum x u l-jum x + 1 (l = tul tal-intervall ta' spezzjoni, normalment jum). Ir-rata medja tal-iżvilupp għal kull reċipjent $\bar{x}$ () huwa kkalkolat skont:

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

fejn:

$\bar{x}$: ir-rata medja tal-iżvilupp għal kull reċipjent

i: l-indiċi tal-intervall ta' spezzjoni

m: in-numru massimu ta' intervalli ta' spezzjoni

f_i : in-numru ta' insetti li feġġew fl-intervall ta' spezzjoni i

n_e : in-numru totali ta' insetti li feġġew fi tmiem l-esperiment ()

x_i : ir-rata tal-iżvilupp tal-insetti li feġġew fl-intervall i

$$x_i = 1/\text{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

fejn:

day_i : jum l-ispezzjoni (jiem mit-tidhil tal-larva)

l_i : tul tal-intervall ta' spezzjoni i (jiem, normalment jum)

Proporzjon tas-sessi

52. Il-proporzjonijiet tas-sessi huma dejta kwantali u għaldaqstant għandhom jiġu evalwati permezz ta' test eżatt ta' Fisher jew metodi xierqa oħrajn. Il-proporzjon naturali tas-sessi ta' *C. riparius* huwa wiehed, jiġifieri l-irġiel u n-nisa huma abbondanti ndaqs. Għaž-żewġ generazzjonijiet, id-dejta dwar il-proporzjon tas-sessi għandu jiġi ttrattat bl-istess mod. Peress li n-numru massimu ta' insetti għal kull reċipjent (jiġifieri 20) huwa baxx wisq għal

▼ **M6**

analizi statistika sinifikanti, in-numru totali ta' insetti li feġġew kompletament u hajjin għal kull sess jingħadd mir-reċipjenti kollha ta' trattament wiehed. Din id-dejta mhux ittrasformata hija ttestjata kontra l-kontroll (bis-solvent) jew dejta kollettiva dwar il-kontroll f'tabella tal-kontinġenza 2×2 .

Riproduzzjoni

53. Ir-riproduzzjoni, bħall-fekondità, hija kkalkolata bħala n-numru ta' ċwiemi bajd għal kull mara. B'mod iktar speċifiku, in-numru totali ta' ċwiemi bajd prodotti f'gaġġa tat-tghammir huwa maqsum bin-numru totali ta' nisa hajjin u mhux korruti mdahhlin f'dik il-gaġġa. NOEC għall-fekondità tista' tiġi stabbilita permezz tal-metodi tal-ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett.
54. Il-fertilità ta' ċwiemi bajd tintuża biex tikkwantifika n-numru ta' ċwiemi bajd fertili għal kull mara. In-numru totali ta' ċwiemi bajd fertili prodotti f'gaġġa tat-tghammir jinqasam bin-numru totali ta' nisa hajjin u mhux korruti mdahhlin f'dik il-gaġġa. NOEC għall-fertilità tista' tiġi stabbilita permezz tal-metodi tal-ANOVA, eż. test ta' Williams jew Dunnett.

Rapport tat-test

55. Ir-rapport tat-test għandu jipprovdi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza kimika tat-test:

- l-għamla fizika u l-karatteristiċi fizikokimiċi (solubilità fl-ilma, il-pressjoni tal-fwar, il-log K_{ow} , il-koeffiċjent ta' partizzjoni fil-ħamrija (jew fin-naqal jekk disponibbli), l-istabbiltà fl-ilma u n-naqal eċċ.);
- dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika (l-isem komuni, isem is-sustanza kimika, il-formula strutturali, in-numru tas-CAS, eċċ.) inklużi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Speċijiet tat-test:

- l-organizmi tat-test użati: l-ispeċijiet, l-isem xjentifiku, is-sors tal-organizmi u l-kundizzjonijiet tat-tghammir;
- informazzjoni dwar kif tqandlu l-mases bajd u l-larva;
- informazzjoni dwar it-tqandil tal-adulti li feġġew tal-ewwel ġenerazzjoni bl-ghajjnuna ta' eżawrient eċċ (ara l-Appendiċi 5)
- l-età tal-organizmi tat-test fil-ħin tat-tidhil fir-reċipjenti tat-test tal-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

- in-naqal użat, jiġifieri naqal naturali jew ifformulat (artifiċjali);
- naqal naturali: post u deskrizzjoni tas-sit mnejn ittiegħed kampjun tan-naqal, inkluża, jekk possibbli, l-istorja tal-kontaminazzjoni; il-karatteristiċi tan-naqal: il-pH, il-kontenut ta' karbonju argoniku, il-proporzjon C/N u l-granulometrija (jekk xieraq).
- naqal ifformulat: thejjija, ingredjenti u karatteristiċi (il-kontenut ta' karbonju organiku, il-pH, l-umdità, eċċ. imkejlin fil-bidu tat-test);
- thejjija tal-ilma tat-test (jekk jintuża ilma rikostitwit) u karatteristiċi (il-konċentrazzjoni tal-ossigenu, il-pH, l-ebusija, eċċ. imkejlin fil-bidu tat-test);

▼ **M6**

- il-fond tan-naqal u l-ilma tal-madwar għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;
- il-volum tal-ilma tal-madwar u tal-pori; il-piż tan-naqal imxarrab bl-ilma tal-pori u mingħajr għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;
- reċipjenti tat-test (il-materjal u d-daqs);
- dixxijiet kristallizzanti (il-materjal u d-daqs);
- il-gaġeġ tat-tgħammir (il-materjal u d-daqs)
- il-metodu tat-thejija tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-konċentrazzjonijiet tat-test għar-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;
- l-applikazzjoni tal-oġġett tat-test fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti: konċentrazzjonijiet tat-test, in-numru ta' rreplikati u solventi, jekk meħtieġa;
- il-kundizzjonijiet tal-inkubazzjoni għar-reċipjenti tat-test: it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl, l-ghoti ta' arja (bzieżaq fis-sekonda);
- il-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni għall-gaġeġ ta' tgħammir u d-dixxijiet kristallizzanti: it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl;
- il-kundizzjonijiet ta' inkubazzjoni għaċ-ċwiemi bajd fil-mikroplatti (jew reċipjenti oħrajn): it-temperatura, iċ-ċiklu u l-intensità tad-dawl;
- informazzjoni ddettaljata dwar it-tmiġh inkluzi t-tip ta' ikel, it-thejija, l-ammont u r-reġim tat-tmiġh.

Riżultati:

- il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet imkejlin tat-test u r-riżultati tal-analizijiet kollha sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti;
- il-kwalità tal-ilma fi hdan ir-reċipjenti tat-test u d-dixxijiet kristallizzanti, jiġifieri l-pH, it-temperatura, l-ossigenu dissolt, l-ebusija u l-ammonijaka;
- is-sostituzzjoni tal-ilma evaporat tat-test għar-reċipjenti tat-test, jekk tkun seħhet;
- in-numru ta' insetti rġiel u nisa li feġġew għal kull reċipjent u għal kull jum għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;
- il-proporzjon tas-sessi tal-insetti li feġġew kompletament u hajjin għal kull trattament għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni
- in-numru ta' larva li naqset milli tfeġġ bħala insetti għal kull reċipjent għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;
- il-perċentwal/frazzjoni tal-feġġa għal kull irreplikant u konċentrazzjoni tat-test (insetti rġiel u nisa kollettivi) għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;
- ir-rata medja tal-iżvilupp tal-insetti li feġġew kompletament u hajjin għal kull irreplikant u r-rata tat-trattament (insetti rġiel u nisa separati u anki kollettivi) għall-ewwel u t-tieni ġenerazzjoni;
- in-numru ta' ċwiemi bajd iddepożitati fid-dixxijiet kristallizzanti għal kull gaġġa tat-tgħammir u l-jum;

▼ **M6**

- il-karatteristiċi ta' kull ċima bajd (daqs, forma u fertilità);
- il-fekondità — in-numru totali ta' ċwiemi bajd għal kull numru totali ta' nisa mdahhlin fil-gaġġa tat-tgħammir;
- il-fertilità — in-numru totali ta' ċwiemi bajd għal kull numru totali ta' nisa mdahhlin fil-gaġġa tat-tgħammir;
- stimi tal-punti ta' tmien tossiċi eż. EC_x (u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati), l-NOEC u l-metodi statistiċi użati sabiex tiġi stabbilita;
- diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

LETTERATURA

- (1) Il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness, It-test dwar it-tossiċità tal-kironomidi tan-naqal-ilma bl-użu ta' ilma miżjud.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (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.
- (7) 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.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662–2674.

▼ **M6**

- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, It-test dwar it-tossicità tal-kironomidi tan-naqal-ilma bl-użu ta' ilma miżjud.
- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
- (17) Weltje, L., Ruffli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- (19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.

▼ M6

- (29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼ M6*Appendiċi 1***Definizzjonijiet**

Għall-fini ta' dan il-metodu ta' ttestjar, jintużaw id-definizzjonijiet li ġejjin:

Sustanza kimika hija sustanza jew tahlita

Naqal ifformulat jew naqal rikostitwit, artifiċjali jew sintetiku huwa tahlita ta' materjali użati biex jimitaw il-komponenti fiżiċi tan-naqal naturali.

Ilma tal-madwar huwa l-ilma li jitqiegħed fuq in-naqal fir-recipient tat-test.

Ilma interstizjali jew ilma tal-pori huwa l-ilma li jikkupa l-post bejn in-naqal u l-partikoli tal-hamrija.

Ilma miżjud huwa l-ilma tat-test li miegħu tiżdied is-sustanza kimika tat-test.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza kimika jew tahlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

▼ M6

Appendiċi 2

Rakkomandazzjonijiet għall-koltura ta' *Chironomus riparius*

1. Larva *Chironomus* tista' titrabba f'dixxijiet kristallizzanti jew kontenituri kbar. Ramel kwarzuż fin jitferrex f'saff irqiq ta' madwar 5 sa 100 mm fond f'qiegħ il-kontenitur. Intwera li anki Kieselgur (eż. Merck, Art 8117) huwa substrat xieraq (saff irqaq sa f'tit mm biss huwa biżżejjed). Imbagħad jitferra' ilma xieraq b'fond sa bosta cm. Il-livelli tal-ilma għandhom jergħu jittellghu kemm ikun hemm b'zonn sabiex jitpatta għat-telf mill-evaporazzjoni, u tiġi evitata dessikazzjoni. L-ilma jista' jibiddel jekk ikun hemm b'zonn. Għandha tinghata arja ħafifa. Ir-riċipjenti li fihom titrabba l-larva għandhom jinżammu f'gaġġa xierqa li ser tevita milli jaharbu l-adulti li jfegġu. Il-gaġġa għandha tkun kbira biżżejjed biex ikunu jistgħu jingemghu l-adulti li jfegġu, inkella ma jkunx jista' jinhareġ kalkolu (minimu huwa ta' madwar 30 × 30 × 30 cm).
2. Il-gaġġa għandhom jinżammu f'temperatura tal-kamra jew f'temperatura ambjentali kostanti ta' 20 ± 2 °C b'fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl (intensità ta' madwar 1 000 lux), 8 sigħat dlam. Gie rrapportat li umdità fl-arja ta' inqas minn 60 % RH tista' timpedixxi r-riproduzzjoni.

Ilma ta' dilwizzjoni

3. Jista' jintuza kwalunkwe ilma naturali jew sintetiku xieraq. Spiss jintużaw ilma tal-bir, ilma tal-vit deklorat u midjums artifiċjali (eż. il-midjum Elendt "M4" or "M7"). L-ilma għandu jinghata l-arja qabel jintuza. Jekk ikun hemm b'zonn, l-ilma tal-koltura jista' jiġġedded billi l-ilma użat jitferra jew jibattal mir-riċipjenti tal-koltura bil-galbu mingħajr ma jinqerdu t-tubi tal-larva.

Tmigh tal-larva

4. Larva *Chironomus* għandha tinghata ikel imsaffaf tal-hut (Tetra Min®, Tetra Phyll® jew ditta simili oħra ta' ikel tal-hut proprjetarju), b'madwar 250 mg għal kull riċipjent kuljum. Dan jista' jinghata bħala trab mithun xott jew bħala sospensjoni fl-ilma: 1,0 g ikel imsaffaf jiżdied ma' 20 ml ilma ta' dilwizzjoni u jithallat sabiex tinghata tahlita omoġena. Din il-preparazzjoni tista' tintema' b'rata ta' madwar 5 ml għal kull riċipjent kuljum. (hezzizha qabel tużaha.) Larva ikbar tista' tinghata iktar.
5. It-tmigh jiġi aġġustat skont il-kwalità tal-ilma. Jekk il-midjum tal-koltura jsir "imċajpar", it-tmigh għandu jitnaqqas. Iz-zidiet tal-ikel għandhom jiġu ssorveljati bil-galbu. Ikel fi kwantitajiet żgħar wisq ser jikkaġuna emigrazzjoni tal-larva lejn il-kolonna tal-ilma, u ikel żejjed ser jikkaġuna attività mikrobjali ikbar u konċentrazzjonijiet inqas tal-ossigenu. Iz-żewġ kundizzjonijiet jistgħu jirriżultaw frati mnaqqsin ta' tkabbir.
6. Jistgħu jiżdiedu wkoll ċerti ċelloli ta' algi ħodor (eż. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) meta jissawru riċipjenti godda tal-koltura.

Tmigh tal-adulti li jfegġu

7. Ċerti sperimentaturi ssuġġerew li tajjara mxappa f'soluzzjoni tas-sukrożju saturat tista' sservi bħala ikel għal adulti li jfegġu.

▼ **M6****Fegġa**

8. $F'20 \pm 2$ °C l-adulti ser jibdwew ifeġġu mir-reċipjenti tat-trobbija tal-larva madwar 13 — 15-il jum wara. L-irġiel faċilment jingharfu minhabba l-antenni pilużi u l-ġisem irqiq tagħhom.

Mases bajd

9. Ladarba l-adulti jkunu preżenti fil-gaġġa tat-tgħammir, ir-reċipjenti kollha tat-trobbija tal-larva għandhom jiġu kkontrollati tliet darbiet fil-gimgha għal depożiti tal-mases bajd ġelatinużi. Jekk ikunu preżenti, il-mases bajd għandhom jitnehhew bil-galbu. Għandhom jiġu ttrasferiti f'dixx żgħir li fih kampjun tal-ilma tat-tgħammir. Il-mases bajd jintużaw biex jinbeda reċipjent ġdid tal-koltura (eż. 2- 4 mases bajd / reċipjent) jew jintużaw għal testijiet tat-tossicità.
10. L-ewwel larva instar għandha tfaqqas wara jumejn — 3.

Tiswir ta' reċipjenti ġodda tal-koltura

11. Ladarba jiġu stabbiliti l-kolturi, għandu jkun possibbli li jissawwar reċipjent tal-koltura tal-larva frisk fil-gimgha jew inqas spiss skont ir-rekwiżiti tal-ittestjar, billi jitnehhew ir-reċipjenti l-qodma wara li jkunu feġġew l-insetti adulti. Bl-użu ta' din is-sistema, tiġi prodotta provvista regolari ta' adulti bl-inqas htieġa ta' ġestjoni.

Thejġija tas-soluzzjonijiet tat-test “M4” u “M7”

12. Elendt (1990) iddeskriva l-midju “M4”. Il-midjum “M7” jithejja bħall-midjum “M4” hliet għas-sustanzi indikati fit-Tabella 1, li għalihom il-koncentrazzjonijiet huma erba' darbiet inqas fl-“M7” meta mqabbla mal-“M4”. Is-soluzzjoni tat-test ma għandhiex tithejja skont Elendt u Bias (1990) għall-koncentrazzjonijiet tal- $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 u K_2HPO_4 mogħtijin għat-thejġija tas-soluzzjonijiet ewlenin, peress li dawn mhumiex adegwati.

Thejġija tal-midjum “M7”

13. Kull soluzzjoni ewlenija (I) tithejja għaliha u soluzzjoni ewlenija kkombinata (II) tithejja minn dawn is-soluzzjonijiet ewlenin (I) (ara t-Tabella 1). Hamsin ml mis-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II) u l-ammonti ta' kull soluzzjoni ewlenija tal-makronutrijenti li jingħataw fit-Tabella 2 fihom sa litru ilma dejonizzat biex jithejja l-midjum “M7”. Soluzzjoni ewlenija tal-vitamiini tithejja billi jiżdiedu tliet vitamiini mal-ilma dejonizzat kif indikat fit-Tabella 3, u 0,1 ml soluzzjoni ewlenija tal-vitamiini kkombinata tiżdied mal-midjum “M7” finali f'it qabel l-użu. Is-soluzzjoni ewlenija tal-vitamiini tinhażen iffriżata f'alikwoti żgħar. Il-midjum jingħata l-arja u jiġi stabbilizzat.

Tabella 1

Soluzzjonijiet ewlenin tal-mikroelementi għall-midjum M4 u M7

Soluzzjonijiet ewlenin (I)	Ammont (mg) magħmul minn litru ilma dejonizzat	Biex thejji s-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II): hallat l-ammonti (ml) li ġejjin tas-soluzzjonijiet ewlenin (I) u tella' sa litru ilma dejonizzat		Koncentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-test (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼ **M6**

Soluzzjonijiet ewlenin (I)	Ammont (mg) magħmul minn litru ilma dejonizzat	Biex thejji s-soluzzjoni ewlenija kkombinata (II): hallat l-ammonti (ml) li ġejjin tas-soluzzjonijiet ewlenin (I) u tella' sa litru ilma dejonizzat		Konċentrazzjonijiet finali f'soluzzjonijiet tat-test (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ × 6H ₂ O ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ × 2H ₂ O ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ × 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ × 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Dawn is-soluzzjonijiet ivarjaw f'M4 u M7, kif indikat iktar 'il fuq.

⁽²⁾ Dawn is-soluzzjonijiet jithejjew għalihom, imbagħad jiferrghu flimkien u jiġu awtoklavati minnufih.

Tabella 2

Soluzzjonijiet ewlenin tal-mikronutrijenti għall-midjum M4 u M7

	Ammont magħmul minn litru ilma dejonizzat (mg)	Ammont ta' soluzzjonijiet ewlenin tal-makronutrijenti miżjud biex jithejja l-midjum M4 u M7 (ml/l)	Konċentrazzjonijiet finali fis-soluzzjonijiet ewlenin M4 u M7 (mg/L)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M6**

Tabella 3

Soluzzjoni ewlenija tal-vitamiġi għall-midjum M4 u M7

It-tliet soluzzjonijiet tal-vitamiġi kollha huma kkombinati biex jiffurmaw soluzzjoni ewlenija waħda tal-vitamiġi.

	Ammont magħmul minn litru ilma dejonizzat (mg)	L-ammont ta' soluzzjoni ewlenija tal-vitamiġi miżjud biex jittejjja l-midjum M4 u M7 (ml/l)	Koncentrazzjonijiet finali fis-soluzzjonijiet ewlenin M4 u M7 (mg/l)
Kloridrat tat-tjamīn	750	0,1	0,075
Ċjanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Bijotina	7,5	0,1	0,00075

REFERENZI

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.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

▼ M6

Appendiċi 3

Thejjija tan-naqal ifformulat

KOMPOŻIZZJONI TAN-NAQAL

Il-kompożizzjoni tan-naqal ifformulat għandha tkun kif ġej:

Kositwent	Karatteristiċi	% tal-piż xott tan-naqal
Pit	Pit ta' sfanju, qrib il-pH 5,5-6,0 kemm jista' jkun, ma jifdal ebda pjanta viżibbli, mithun sew (daqs tal-partikoli ≤ 1 mm) u mnixxef bl-arja	4 — 5
Ramel kwarzuż	Daqs tal-ħhub: > 50 % tal-partikoli għandhom ikunu fil-medda ta' 50-200 μm	75 — 76
Tafal tal-kawlina	Kontenut ta' kawlina ≥ 30 %	20
Karbonju organiku	Aġġustat biż-żieda tal-pit u r-ramel	2 ($\pm 0,5$)
Karbonat tal-kalċju	CaCO_3 , pulverizzat, kimikament pur	0,05 — 0,1
Ilma	Kondottività ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30 — 50

THEJJIIJA

Il-pit jitnixxef bl-arja u mithun għal trab irqiq. Tigi ppreparata sospensjoni tal-ammont mehtieg ta' trab tal-pit f'ilma dejonizzat permezz ta' apparat ta' omoġenizzazzjoni bi prestazzjoni għolja. Il-pH ta' din is-suspensjoni huwa aġġustat għal $5,5 \pm 0,5$ b' CaCO_3 . Is-suspensjoni tigi kkondizzjonata għal tal-inqas jumejn b'thawwid bil-galbu f' 20 ± 2 °C, sabiex tigi stabbilizzata l-pH u jiġi stabbilit komponent mikrobjali stabbli. Il-pH terġa' titkejjel u għandha tkun ta' $6,0 \pm 0,5$. Imbagħad is-suspensjoni tal-pit tithallat ma' kositwenti ohra (ramel u tafal tal-kawlina) u ilma dejonizzat biex jinkiseb naqal omoġenju b'kontenut ta' ilma f'medda ta' 30–50 fil-mija ta' piż xott tan-naqal. Il-pH tat-taħlita finali jerga' jitkejjel u jiġi aġġustat bejn 6,5 u 7,5 b' CaCO_3 jekk ikun mehtieg. Jittiehdu kampjuni tan-naqal biex jiġi ddeterminat il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Imbagħad, qabel ma jintuza fit-test tat-tossiċità tal-kironomidi, huwa rrakkomandat li n-naqal ifformulat jiġi kkondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet prevalenti fit-test sussegwenti.

HŻIN

Il-kositwenti nixfin għat-thejjija tan-naqal artifiċjali jistghu jinħażnu f'post xott u frisk f'temperatura tal-kamra. In-naqal ifformulat (imxarrab) ma għandux jinħażen qabel ma jintuza fit-test. Għandu jintuza minnufih wara perjodu ta' kundizzjonament ta' 7 ijiem li jtemm it-thejjija tiegħu.

REFERENZI

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludge worms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

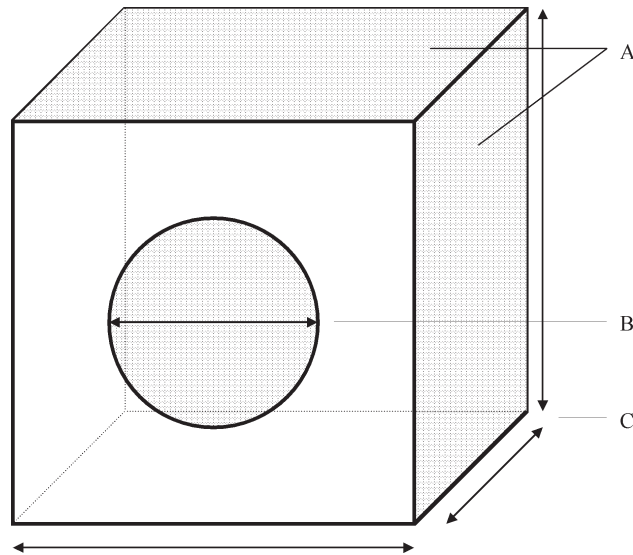
▼ **M6***Appendiċi 4***Karatteristiċi tas-sustanzi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli**

KOSTITWENT	KONĊENTRAZZJ- ONIJET
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Gebbla bħal CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Kloru residwu	< 10 µg/l
Pesticidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pesticidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

(*) Madankollu, ta' min jinnota li jekk ikun hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija u s-sustanza kimika tat-test, għandu jintuża l-ilma bl-inqas ebusija (u b'hekk, il-Midjum M4 ta' Elendt ma għandux jintuża f'din is-sitwazzjoni).

▼ **M6***Appendiċi 5***Gwida għat-twettiq tat-test**

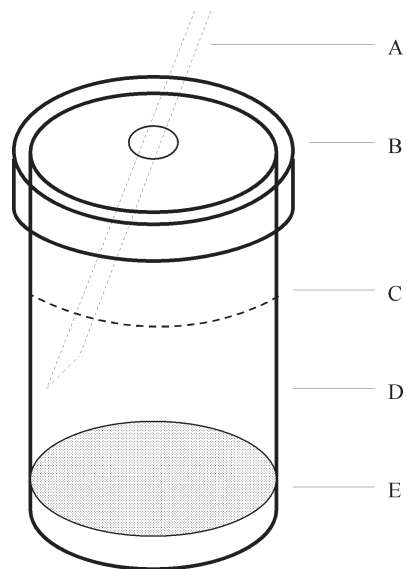
Eżempju ta' gaġġa tat-tgħammir:



- A: xibka fuq u tal-inqas waħda fil-ġenb tal-gaġġa (daqs tal-malja ta' madwar 1 mm)
- B: fetha għat-tqeghid tal-adulti li jfegġu fil-gaġġa tat-tgħammir u sabiex jitnehhew iċ-ċwiemi bajd imbajdin mid-dixxijiet kristallizzanti (mhux murija f'din il-grafika)
- C: daqs minimu tal-gaġġa tat-tgħammir: tul ta' 30 cm, għoli ta' 30 cm u wisgħa ta' 30 cm

▼ **M6**

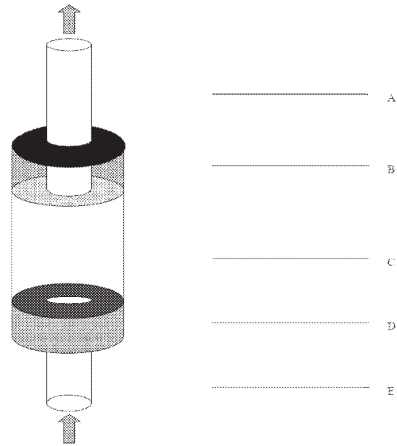
Eżempju ta' reċipjent tat-test:



- A: pipetta Pasteur għall-provvista tal-arja fl-arja tal-madwar
- B: għatu tal-ħġieġ biex jiġi evitat milli jaharbu l-insetti
- C: saff tal-wiċċ tal-ilma
- D: reċipjent tat-test (bekk tal-ħġieġ tal-inqas ta' 600 ml)
- E: saff tan-naqal

▼ **M6**

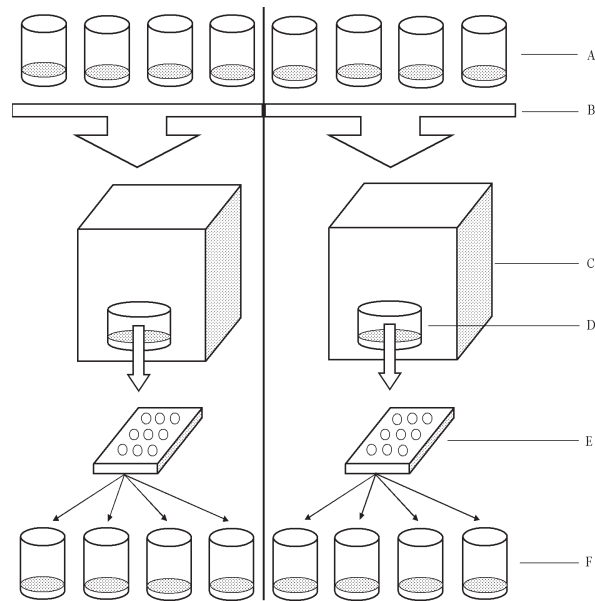
Eżempju ta' eżawrient għall-qbid tal-insetti adulti (il-vleġeġ jindikaw id-direz-
zjoni tal-fluss tal-arja):



- A: tubu tal-ħġieġ (dijametru intern ta' madwar 5 mm) imqabbad ma' pompa awtokarikata
- B: tapp tas-sufra tal-lasktu vulkanizzat, perforat b'tubu tal-ħġieġ (A). Fuq ġewwa, il-fetha tat-tubu tal-ħġieġ (A) titgħatta b'xi qoton u xibka (daqqs tal-malja ta' madwar 1 mm) biex tiġi evitata ħsara lill-insetti meta jingibdu fl-eżawrient
- C: kontenitur trasparenti (plastik jew ħġieġ, tul ta' madwar 15-il cm) għall-insetti maqbudin
- D: tapp tas-sufra tal-lasktu vulkanizzat, perforat b'tubu (E). Biex l-insetti jinhelsu fil-gaġġa tat-tgħammir, it-tapp tas-sufra D jinħall mill-kontenitur C
- E: tubu (plastik jew ħġieġ, dijametru ta' ġewwa ta' madwar 8 mm) biex l-insetti adulti jingabru mir-reċipjent

▼ **M6**

Preżentazzjoni skematika ta' test taċ-ċiklu tal-ħajja:



- A: l-ewwel ġenerazzjoni — reċipjenti tat-test li fihom sistema ta' naqal-ilma, tmien irreplikati, 20 larva tal-ewwel instar għal kull reċipjent
- B: erba' reċipjenti tat-test għal kull gaġġa tat-tgħammir, A u B
- C: gaġġ tat-tgħammir (A u B) għall-iffullar, it-tgħammir u l-ovipożizzjoni
- D: dixxijiet kristallizzanti għad-depożitu ta' ċwiemi bajd
- E: mikroplatti, toqba wahda għal kull ċima bajd
- F: it-tieni ġenerazzjoni — reċipjenti tat-test li fihom sistema ta' naqal-ilma, tmien irreplikati, 20 larva tal-ewwel instar għal kull reċipjent.

▼ M6

C.41. TEST TAL-IŻVILUPP SESSWALI TAL-HUT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar (TG) 234 tal-OECD (2011). Huwa bbazat fuq deċizzjoni mill-1998 li jiġu żviluppati metodi ta' ttestjar godda jew li jiġu aġġornati daww eżistenti għat-tgħarbil u l-ittestjar ta' interferenti endokrinali potenzjali. It-Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Hut (FSDT) ġie identifikat bħala metodu ta' ttestjar promettenti li jkopri stadju sensitiv fil-hajja tal-hut responsiv kemm għal sustanzi kimiċi li jibxhu lill-estrogen kif ukoll lill-androgen. Bejn l-2006 u l-2010 il-metodu ta' ttestjar sarlu eżerċizzju ta' validazzjoni interlaboratorja, li fih il-medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*), iż-żebra (*Danio rerio*) u l-ispinarell (*Gasterosteus aculeatus*) ġew invalidati u l-karpjun buras (*Pimephales promelas*) ġie parzjalment invalidat (41) (42) (43). Dan il-protokoll jinkludi l-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra. Fil-prinċipju, il-protokoll huwa tishih tat-TG 210 tal-OECD "Fish, Early Life Stage Toxicity Test" (1), li fiha l-espożizzjoni titkompla sakemm il-hut ikun sesswalment differenzjat, jiġifieri madwar 60 jum wara t-tifqis (dph) għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra (il-perjodu ta' espożizzjoni jista' jkun iqsar jew itwal għal speċijiet oħrajn li jiġu vvalidati fil-ġejjieni), u żdiedu punti ta' tmiem sensitivi għall-endokrina. L-FSDT jivvaluta l-effetti fl-istadju bikri tal-hajja u l-konsegwenzi avversi potenzjali ta' sustanzi kimiċi li huma interferenti endokrinali putattivi (eż. estrogeni, androgeni u inibituri tal-isterojdoġenesi) fuq l-iżvilupp sesswali. It-tahlita taż-żewġ punti ta' tmiem ċentrali, il-konċentrazzjoni tal-vitellogenina (VTG) u l-proporzjon tas-sessi fenotipici jippermettu sabiex it-test jindika l-modalità ta' azzjoni tas-sustanza kimika tat-test. Minhabba l-bidla relevanti għall-popolazzjoni fil-proporzjon tas-sessi fenotipici, l-FSDT jista' jintuża għal valutazzjoni tal-perikli u r-riskji. Madankollu, jekk it-test jintuża għal valutazzjoni tal-perikli u r-riskji, ma għandux jintuża l-ispinarell għaliex id-dejta ta' validazzjoni disponibbli s'issa wriet li f'din l-ispeċi l-alterazzjonijiet tal-proporzjon tas-sessi fenotipici mis-sustanzi kimiċi tat-test ma kinux komuni.
2. Il-protokoll huwa msejjes fuq hut espost bl-ilma għal sustanzi kimiċi matul il-perjodu tas-sess li fih il-hut huwa mistenni jkun iktar sensitiv għall-effetti tas-sustanzi kimiċi li huma interferenti endokrinali li jxekklu l-iżvilupp sesswali. Jitkejlu żewġ punti ta' tmiem ċentrali bħala indikaturi ta' aberrazzjonijiet tal-iżvilupp assoċjati mal-endokrina, il-konċentrazzjonijiet tal-VTG u l-proporzjonijiet tas-sessi (proporzjonijiet tas-sessi) stabbiliti bl-istologija tal-gonadi. L-istopatologija gonadali (evalwazzjoni u sejbien tal-istadju tal-oociti u ċelloli spermatogenetici) mhijiex obbligatorja. Barra minn hekk, is-sess ġenetiku huwa stabbilit kull meta jkun possibbli (eż. fil-medaka Ġappuniża u l-ispinarell). Il-preżenza ta' markatur tas-sess ġenetiku hija vantaġġ kbir peress li żżid is-saħha tal-istatistika tal-proporzjon tas-sessi u tippermetti li jiġi identifikat bdil lura tas-sess fenotipiku individwali. Punti ta' tmiem apikali oħrajn li għandhom jitkejlu jinkludu r-rata tat-tifqis, is-sopravivenza, it-tul u l-piż tal-ġisem. Il-metodu ta' ttestjar jista' jkun adattabbli għal speċijiet oħrajn minbarra daww imsemmijin hawn fuq diment li l-ispeċijiet l-oħrajn issirihom validazzjoni bħal dik li saret għall-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra, li l-hut tal-kontroll ikunu sesswalment differenzjati fi tmiem it-test, li l-livelli tal-VTG ikunu għoljin biżżejjed biex jiġu identifikati varjazzjonijiet sinifikanti marbutin mas-sustanza kimika, u li s-sensittività tas-sistema tat-test tiġi stabbilita bl-użu ta' sustanzi kimiċi ta' referenza attivi fl-endokrina ((anti)-estrogeni, (anti)-androgeni, inibituri tal-aromatażi eċċ). Barra minn hekk, kwalunkwe rapport ta' validazzjoni li jirreferi għal dejta tal-FSDT li tuża speċijiet oħrajn għandu jiġi rivedut mill-OECD, u l-eżitu tal-validazzjoni għandu jitqies sodisfaċenti.

▼ M6

Kunsiderazzjonijiet inizjali u limitazzjonijiet

3. Normalment il-VTG tiġi prodotta mill-fwied tal-vertebrati oviparużi nisa bħala rispons għall-estrogen endoġenu ċirkolanti (2). Hija prekursor tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mademm fl-ovarju, fejn tittiehed u tiġi mmodifikata mill-bajd fi żvilupp. Is-sintesi tal-VTG hija ferm limitata, għad li identifikabbli, f'hut immatur u hut irġiel adulti għaliex dawn ma għandhomx biżżejjed estrogen ċirkolanti. Madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi VTG bħala rispons għal stimolazzjoni tal-estrogen esoġena (3) (4) (5).
4. Il-kejl tal-VTG iservi għall-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi b'modalitajiet ta' azzjoni estrogeniċi, antiestrogeniċi u androgeniċi u sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-isterojdoġenesi bħal pereżempju inibituri tal-aromatażi. L-identifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi estrogeniċi hija possibbli bil-kejl tat-tidhli tal-VTG f'hut irġiel, u din giet iddokumentata hafna f'tagħrif xjentifiku evalwat bejn il-pari. L-induzzjoni tal-VTG intweriet wara l-espożizzjoni għal androgeni aromatizzabbli wkoll (6) (7). Tnaqqis fil-livell ċirkolanti tal-estrogen fin-nisa, pereżempju bl-inibizzjoni tal-aromatażi li tikkonverti l-androgen endoġenu fl-estrogen naturali 17 β -oestradiol, jikkaguna tnaqqis fil-konċentrazzjoni tal-VTG, li tintuża biex jiġu identifikati sustanzi kimiċi bi karatteristiċi li jinibixxu l-aromatażi jew inibituri tal-isterojdoġenesi b'mod iktar mifrux (33). Ir-relevanza bijoloġika tar-rispons tal-VTG wara inibizzjoni estrogenika/tal-aromatażi hija stabbilita u giet iddokumentata sew (8) (9). Madankollu, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tista' tiġi affettwata mit-tossiċità ġenerali u l-modalitajiet ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali.
5. Ġew żviluppati u standardizzati b'suċċess bosta metodi ta' kejl għall-użu b'rutina sabiex il-VTG tiġi kkwantifikata f'kampjuni tad-demm, il-fwied, il-ġisem shih jew l-omoġenati tar-ras/tad-denb miġburin minn hut individwali. Dan huwa l-każ għaž-żebra, l-ispinarell u l-medaka Ġappuniża u anki l-ispeċi parzjalment invalidata karpjun buras; il-metodi speċifiċi għall-ispeċi tal-Assaġġ tal-Immunosorbenti Marbut mal-Enzimi (ELISA) li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-VTG huma disponibbli (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Fil-medaka Ġappuniża u ż-żebra, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla minn kampjuni tal-plażma tad-demm, il-fwied u l-omoġenati għad li l-omoġenati għandhom tendenza li juru valuri ftit inqas minn plażma (17) (18) (19). L-Appendiċi 5 jipprovdi l-proċeduri rrakkomandati għall-ġbir tal-kampjuni għal analiżi tal-VTG.
6. Bidla fil-proporzjon tas-sessi fenotipiċi (proporzjonijiet tas-sessi) hija punt ta' tmim li jirrifletti bidla lura fis-sess. Fil-prinċipju, sustanzi kimiċi li jinibixxu estrogeni, antiestrogeni, androgeni, antiandrogeni u steroidoġenesi jistgħu jaffettwaw il-proporzjon tas-sessi tal-hut fi żvilupp (20). Intwera li din il-bidla lura tas-sess hija parzjalment reversibbli fiż-żebra (21) wara espożizzjoni għas-sustanza kimika li tixbah l-estrogen, filwaqt li l-bidla lura tas-sess wara espożizzjoni għas-sustanza kimika li tixbah l-androgen hija permanenti (30). Is-sess huwa ddefinit bħala mara, raġel, interess (kemm ooċiti kif ukoll ċelloli spermatogeniċi f'gonada waħda) jew mhux differenzjat, stabbilit f'hut individwali permezz ta' eżaminazzjoni istoloġika tal-gonadi. Tingħata gwida fl-Appendiċi 7 u fl-“OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (22).
7. Is-sess ġenetiku huwa eżaminat permezz ta' markaturi ġenetiċi meta jkunu jeżistu fi speċi partikolari tal-hut. Fil-medaka Ġappuniża, il-ġeni XX tan-nisa jew XY tal-irġiel jistgħu jiġu identifikati bir-Reazzjoni Katina tal-Polimerażi

▼ **M6**

(PCR), jew inkella l-gene tad-dominju DM marbut mal-Y (DMY) jista' jiġi analizzat (negattiv jew pozittiv għad-DMY) kif deskritt fi (23) (24). Fl-isprinarell, hemm metodu ekwivalenti tal-PCR sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku deskritt fl-Appendiċi 10. Meta s-sess ġenetiku jkun jista' jintrabat b'mod individwali għas-sess fenotipiku, is-sahha tat-test titjeb u għaldaqstant is-sess ġenetiku għandu jiġi stabbilit fi speċijiet b'markaturi tas-sess ġenetiku ddokumentati.

8. Iż-żewġ punti ta' tmiem endokrinali ċentrali, il-VTG u l-proporzjon tas-sess, flimkien, jistgħu juru l-modalità ta' azzjoni endokrinali (MOA) tas-sustanza kimika (Tabella 1). Il-proporzjon tas-sessi huwa bijomarkatur relevanti għall-popolazzjoni (25) (26) u għal ċerti modalitajiet ta' azzjoni ddefiniti sew, ir-riżultati tal-FSDT jistgħu jintużaw għal skopijiet ta' valutazzjoni tal-perikli u r-riskji meta dan jitqies xieraq mill-aġenzija regolatorja. Bhalissa, dawn il-modalitajiet ta' azzjoni huma estrogeni, androgeni u inibituri tal-isterojdoġenesi.

Tabella 1

Reazzjoni tal-punti ta' tmiem endokrinali għal modalitajiet ta' azzjoni differenti tas-sustanzi kimiċi:

↑ = f'żieda, ↓ = f'naqqis, — = mhux investigati

MOA	VTG ♂	VTG ♀	Proporzjon tas-sessi	Referenzi
Agonist dghajjef tal-estrogen	↑	↑	↑♀ jew ↑Mhux diff	(27) (40)
Agonist b'sahhtu tal-estrogen	↑	↑	↑♀ jew ↑Mhux diff, Le ♂	(28) (40)
Antagonist tal-estrogen	—	—	↓♀, ↑ Mhux diff.	(29)
Agonist tal-androgen	↓ jew —	↓ jew —	↑ ♂, Le ♀	(28) (30)
Antagonist tal-androgen	—	—	↑♀ Intersess	(31)
Inibitur tal-Aromatazi	↓	↓	↓♀	(33)

9. L-FSDT ma jkoprix l-istadju riproduttiv tal-hajja tal-hut u, għaldaqstant, is-sustanzi kimiċi li huma ssuspettati li jaffettwaw ir-riproduzzjoni f'koncentrazzjonijiet inqas mill-iżvilupp sesswali għandhom jiġu eżaminati f'test li jkopri r-riproduzzjoni.
10. Fl-Appendiċi 1 jingħataw id-definizzjonijiet għall-fini ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.
11. L-FSDT *in vivo* huwa mahsub sabiex jidentifika sustanzi kimiċi bi karatteristiċi androgeniċi u estrogeniċi kif ukoll karatteristiċi li jinibixxu antiandrogeni, antiestrogeni u sterojdoġenesi. Il-fażijiet ta' validazzjoni tal-FSDT (1 u 2) koprew sustanzi kimiċi li jinibixxu estrogeni, androgeni u sterojdoġenesi. L-effetti fl-FSDT ta' antagonisti tal-estrogen u l-androgen jistgħu jinkisbu mit-Tabella 1 iżda dawn l-MOA huma inqas iddokumentati bhalissa.

IL-PRINCIPJU TAT-TEST

12. Fit-test, il-hut huwa espost, minn bajd iffertilizzat għid sat-tlestija tad-differenzazzjoni sesswali, għal tal-inqas tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test dissolta fl-ilma. Il-kundizzjonijiet tat-test għandhom ikunu bi fluss kontinwu sakemm dan ma jkunx possibbli minhabba d-disponibilità jew l-għamla (eż. solubilità limitata) tas-sustanza kimika tat-test. It-test jibda billi l-bajd iffertilizzat għid (qabel il-qasma tal-blastodiska) jitqiegħed fil-kompartimenti tat-test. It-tagħbija tal-kompartimenti hija deskritta għal kull

▼ **M6**

speċi fil-paragrafu 27. Għall-ispeċijiet tal-hut invalidati, il-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra, it-test jintemm f'60 dph. Fi tmiem it-test, il-hut kollu jiġi ewtanizzat b'mod dinjituż. Kampjun bijoloġiku (plażma tad-demm, fwied jew omoġenat tar-ras/tad-denb) jingabar għal analiżi tal-VTG minn kull huta u l-parti li jifdal tiġi f'fissata għal evalwazzjoni istoloġika tal-gonadi sabiex jiġi stabbilit is-sess fenotipiku; tista' ssir istopatoloġija (eż. sejbien tal-istadju tal-gonadi, severità tal-interess). Fi speċijiet li għandhom il-markaturi xierqa jittiehed kampjun bijoloġiku (il-pinna anali jew dorsali) sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku (Appendiċijiet 9 u 10).

13. Harsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet rilevanti tat-test għal speċijiet invalidati: Il-medaka Ġappuniża, l-ispinarell u ż-żebra huma pprovduti fl-Appendiċi 2.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

14. Ir-riżultati minn test tat-tossiċità akuta jew assaġġ iehor tat-tossiċità fuq terminu qasir [eż. il-metodu ta' ttestjar C.14 (34) u it-TG 210 tal-OECD (1)], li idealment isir bl-ispeċijiet magħżulin għal dan it-test, għandhom ikunu disponibbli. Dan jimplika li s-solubilità fl-ilma u l-pessjoni tal-fwar tas-sustanza kimika tat-test huma magħrufin u huwa disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fil-kompartimenti tat-test, bi preċizzjoni magħrufa u rrapportata u limitu tal-identifikazzjoni.
15. Informazzjoni siewja oħra tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza kimika, l-istabbiltà fl-ilma u d-dawl, pKa, P_{ow} u r-riżultati ta' test għal bijodegradabilità lesta (Metodu ta' Ttestjar C.4) (35).

Kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test

16. Sabiex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:
 - Il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt għandha tkun tal-inqas 60 fil-mija tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja (ASV) tul it-test;
 - It-temperatura tal-arja ma għandhiex tvarja b'iktar minn $\pm 1,5$ °C bejn il-kompartimenti tat-test fi kwalunkwe hin matul il-perjodu ta' espożizzjoni u trid tinzamm fi hdan il-meded tat-temperatura speċifikati għall-ispeċijiet tat-test (Appendiċi 2);
 - Metodu vvalidat għall-analiżi tas-sustanza kimika ta' espożizzjoni b'limitu ta' detezzjoni ferm inqas mill-inqas konċentrazzjoni nominali għandu jkun disponibbli u għandha tingabar evidenza sabiex jintwera li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni nżammu b'mod sodisfaċenti fi hdan ± 20 % tal-valuri medjin imkejlin;
 - Is-sopravivenza ġenerali tal-bajd iffertilizzat fil-kontrolli u, meta rilevanti, fil-kontrolli bis-solvent, għandha tkun ikbar minn jew daqs il-limiti ddefiniti fl-Appendiċi 2;
 - Il-kriterji ta' aċċettazzjoni marbutin mat-tkabbir u l-proporzjonijiet tas-sess fi tmiem it-test huma bbażati fuq dejta mill-gruppi tal-kontroll (kontroll bl-ilma u s-solvent kollettivi sakemm ma jvarjawx hafna, f'liema każ solvent biss);

▼ M6

		Medaka Ġappuniża	Żebra	Spinarell
Tkabbir	Piż imxarrab tal-hut, imnixxef bit-taptip	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Tul (tul standard)	> 20mm	> 14 mm	> 20 mm
Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa)		30-70 %	30-70 %	30-70 %

- Meta jintuża solvent, dan ma għandu jkollu ebda effett statistikament sinifikanti fuq is-sopravivenza u ma għandux jipproduċi xi effett ta' interferent endokrinali jew xi effett avvers iehor fuq l-istadji bikrin tal-hajja li jinstabu minn kontroll bis-solvent.

Jekk tiġi osservata devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tad-dejta tat-test u dawn il-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inkluzi fir-rapportar.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Kompartimenti tat-test

17. Jista' jintuża kwalunkwe kompartiment tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli jew xi kompartiment iehor kimikament inert. Id-dimensjonijiet tal-kompartimenti għandhom ikunu kbar biżżejjed biex tinzamm konformità mal-kriterji dwar ir-rata ta' tagħbija mogħtijin hawn taht. Idealment, il-kompartimenti tat-test jitqiegħdu f'pożizzjoni għal għarrieda fiż-żona tat-test. Disinn għal għarrieda tal-blokk b'kull konċentrazzjoni preżenti f'kull blokk huwa ppreferut meta mqabbel ma' disinn kompletament għal għarrieda. Il-kompartimenti tat-test għandhom ikunu protetti minn disturbanza mhux mixtieqa.

Għażla tal-ispeċijiet

18. L-ispeċijiet irrakkomandati tal-hut jingħataw fl-Appendiċi 2. Il-proċeduri għall-inkluzjoni ta' speċijiet godda jingħataw fil-paragrafu 2.

Iż-żamma tal-hut ġenituri

19. Id-dettalji dwar iż-żamma tal-hut ġenituri f'kundizzjonijiet sodisfaċenti jistgħu jinkisbu mit-TG 210 tal-OECD(1). Il-hut ġenituri għandhom jintemgħu darba jew darbtejn kuljum b'ikel xieraq.

Tqandil ta' embrijuni u larva

20. Għall-ewwel, l-embrijuni u l-larva jistgħu jiġu esposti fi hdan kompartiment ewlieni f'komponenti tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli, mghammrin bi xbieki fil-ġenb jew fit-truf biex ikun hemm fluss tas-sustanza kimika tat-test fi hdan il-komponent. Fluss mhux turbolenti fi hdan dawn il-kompartimenti zgħar jista' jiġi indott billi jiġu sospizi minn fergħa mqiegħda biex il-kompartiment jiċċaqlaq 'il fuq u 'l isfel filwaqt li l-organizmi jibqgħu mghaddsin.
21. Meta jkunu intużaw kontenituri tal-bajd, grilji jew xbieki biex il-bajd jinżamm fi hdan il-kompartiment ewlieni tat-test, dawn ir-restrizzjonijiet għandhom jitnehhew wara li tfaqqas il-larva, hlief li x-xbieki għandhom jinżammu biex jiġi evitat milli jgħarab il-hut. Jekk ikun hemm bżonn li tiġi trasferita l-larva, din ma għandhiex tkun esposta għall-arja u ma għandhomx jintużaw xbieki biex il-hut jinheles minn kontenituri tal-bajd. It-twaqqit ta' dan it-trasferiment iwarja skont l-ispeċijiet u mhux bilfors dejjem ikun hemm bżonn isir trasferiment.

▼ **M6****Ilma**

22. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test turi sopravivenza bil-kontroll li tal-inqas tkun tajba daqs fl-ilma deskritta fl-Appendiċi 3 huwa xieraq bhala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma ta' dilwizzjoni mhuwiex ser ikollu influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test (pereżempju b'reazzjoni mas-sustanza kimika tat-test) jew jaffettwa b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk tad-duqqajs, għandhom jittiehdu kampjuni f'intervalli għal analiżi. Il-karbonju organiku totali, il-konduttività, il-pH u s-solidi sospiżi għandhom jitkejlu, pereżempju kull tliet xhur meta l-ilma ta' dilwizzjoni jkun magħruf li huwa ta' kwalità relattivament kostanti. Għandhom isiru kejljet tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni l-kbar (eż. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) u l-pestiċidi, jekk ikun hemm dubji dwar il-kwalità tal-ilma. Id-dettalji dwar analiżi kimika u l-ġbir tal-ilma jistgħu jinkisbu mill-paragrafu 34.

Soluzzjonijiet tat-test

23. Jekk dan ikun possibbli fil-prattika, għandha tintuża sistema bi fluss kontinwu. Għal testijiet bi fluss kontinwu, sistema b'distribuzzjoni u dilwizzjoni kontinwi ta' soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, u sistema ta' saturatur) hija mehtieġa sabiex tiddaħhal sensjela ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-ilma ta' dilwizzjoni għandhom jiġu kkontrollati f'ċerti intervalli matul it-test u ma għandhomx iwarjaw b'iktar minn 10 % matul it-test. Instab li rata tal-fluss ekwivalenti għal tal-inqas hames volumi tal-kompartimenti tat-test kull 24 siegħa hija xierqa (1). Għandha tingħat attenzjoni sabiex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik jew materjali oħrajn, u whud minnhom jista' jkun fihom sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi jew jistgħu jassorbu s-sustanza kimika tat-test.
24. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tithejja mingħajr l-użu ta' solventi permezz ta' sempliċi tahlit jew ċaqliq tas-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. thawwid jew ultrasonikazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test diffiċli biex tinhall fl-ilma, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri deskritti fl-OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (36). L-użu ta' solventi għandu jiġi evitat iżda jista' jkun mehtieġ f'ċerti każijiet sabiex tiġi prodotta soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif suppost. Eżempji ta' solventi xierqa jingħataw f'(36).
25. Għandhom jiġu evitati kundizzjonijiet tat-test semistatiċi sakemm ma tingħatax ġustifikazzjoni għar-raġunijiet validi assoċjati mas-sustanza kimika tat-test (eż. stabbiltà, disponibiltà limitata, spejjeż għoljin jew perikli). Għat-teknika semistatika, jistgħu jiġu segwiti żewġ proċeduri differenti ta' tiġdid. Is-soluzzjonijiet tat-test il-ġodda jithejjew f'kompartimenti nodfa u bajd sopravissuti u larva ttrasferita bil-galbu fil-kompartimenti l-ġodda, jew l-organizmi tat-test jinżammu fil-kompartimenti tat-test filwaqt li kuljum jinbidel proporzjon (tal-inqas żewġ terzi) mill-ilma tat-test.

PROCEDURA**Kundizzjonijiet tal-Espożizzjoni***Ġbir tal-bajd u d-durata*

26. Biex jiġi evitat preġudizzju ġenetiku, il-bajd jingħabar minn tal-inqas tliet pari jew gruppi tat-tgħammir, imhalltin u magħżulin għal għarrieda biex jinbeda t-test. Għall-ispirarell, ara d-deskrizzjoni tal-fertilizzazzjoni artifiċjali fl-Appendiċi 11. It-test għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara li jkun

▼ **M6**

gie ffertilizzat il-bajd, idealment filwaqt li l-embrijuni jitghaddsu fis-soluzzjonijiet tat-test qabel tibda l-qasma blastodiska, jew ftit kemm jista' jkun wara dan l-istadju u mhux iktar tard minn 12-il siegħa wara l-fertilizzazzjoni. It-test għandu jkompli sakemm titlesta d-differenzazzjoni sesswali fil-grupp bil-kontroll (60 dph għall-medaka Gappuniża, l-ispinarell u ż-żebra).

Tagħbija

27. In-numru ta' bajd iffertilizzat fil-bidu tat-test għandu jkun tal-inqas 120 għal kull konċentrazzjoni maqsum bejn tal-inqas 4 irreprikati (allokazzjoni tal-għerq kwadrat għall-kontroll hija aċċettata). Il-bajd għandu jitqassam għal għarrieda (bl-użu ta' tabelli statistiċi għal każwalizzazzjoni) bejn it-trattamenti. Ir-rata tat-tagħbija (għad-definizzjoni, ara l-Appendiċi 1) għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex tkun tista' tinżamm konċentrazzjoni tal-ossigenu dissolt ta' tal-inqas 60 % tal-ASV mingħajr ma tingħata arja diretta fil-kompartimenti. Għal testijiet bi fluss kontinwu, hija rrakkomandata rata tat-tagħbija li ma taqbiżx iż-0,5 g/l f'24 siegħa, u li ma taqbiżx il-5 g/l tas-soluzzjoni fi kwalunkwe hin. Xejn iktar tard minn 28 jum wara l-fertilizzazzjoni, in-numru ta' hut għal kull irreprikat għandu jerga' jiġi distribwit, b'tali mod li kull irreprikat ikun fih numru kemm jista' jkun indaqs ta' hut. Jekk issehh mortalità relatata mal-espożizzjoni, in-numru ta' rreprikati għandu jitnaqqas kif xieraq b'tali mod li d-densità tal-hut bejn il-livelli tat-trattament jinżamm indaqs kemm jista' jkun.

Dawl u temperatura

28. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu xierqa għall-ispeċijiet tat-test (ara l-Appendiċi 2 għall-kundizzjonijiet sperimentali għall-FSDT).

Tmigh

29. L-ikel u t-tmigh huma kritiċi, u huwa essenzjali li jingħata l-ikel it-tajjeb għal kull stadju f'intervalli xierqa ta' hin u f'livell biżżejjed sabiex isostni t-tkabbir normali. It-tmigh għandu jkun *ad libitum* filwaqt li jiġi minimizzat l-eċċess. Biex tinkiseb rata biżżejjed tat-tkabbir, il-hut għandu jintema' tal-inqas darbtejn kuljum (aċċettat darba kuljum fi tmiem il-ġimgħa), b'intervall minimu ta' tliet sigħat bejn kull tmigh. Għandhom jitnehhew ikel u rawt zejda, skont kif ikun hemm b'żonn, sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni ta' skart. Hi u tinkiseb esperjenza, l-ikel u r-reġimi tat-tmigh ikomplu jiġu rfinati sabiex titjeb is-sopravivenza u jiġi ottimizzat it-tkabbir. Għaldaqstant għandu jsir sforz sabiex jiġi kkonfermat ir-reġim propost ma' esperti rikonoxxuti. It-tmigh għandu jiġi pprojbit 24 siegħa qabel jinetmm it-test. Eżempji ta' oġġetti xierqa tal-ikel huma elenkati fl-Appendiċi 2 (ara wkoll l-OECD Fish Testing Framework (39)).

Konċentrazzjonijiet tat-test

30. Is-sustanzi kimiċi tat-test huma spazjati kif deskritt fl-Appendiċi 4. Tal-inqas għandhom jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tat-test f'tal-inqas erba' rreprikati. Il-kurva li tirrelata l-LC₅₀ ma' perjodu ta' espożizzjoni fl-istudju akuti disponibbli għandha tiġi kkunsidrata meta tingħażel il-medda ta' konċentrazzjonijiet tat-test. Huma rrakkomandati hames konċentrazzjonijiet tat-test jekk għandha tintuża d-dejta għall-valutazzjoni tar-riskju.
31. Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika oghla minn 10 % tal-LC₅₀ akuta fl-adulti jew 10 mg/l, tkun liema tkun l-inqas wahda, ma għandhomx b'żonn jiġu ttestjati. Il-konċentrazzjoni massima tat-test għandha tkun 10 % tal-LC₅₀ fl-istadju tal-hajja tal-larva/taz-zgħar.

▼ **M6****Kontrolli**

32. Għandu jsir kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (≥ 4 irreprikati) u, jekk relevanti, kontroll bis-solvent (≥ 4 irreprikati) minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Fit-test għandhom jintużaw biss solventi li ġew investigati u li ma għandhom ebda influwenza statistikament sinifikanti fuq il-punti ta' tmiem tat-test.
33. Meta jintuża solvent, il-konċentrazzjoni finali tiegħu ma għandhiex tkun ikbar minn 0,1 ml/l (36) u għandha tkun l-istess konċentrazzjoni fil-kompartimenti kollha tat-test, hlief il-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Madankollu, għandu jsir kull sforz sabiex jiġi evitat l-użu tat-tali solvent jew sabiex jinżammu konċentrazzjonijiet tas-solvent għall-minimu possibbli.

Frekwenza tad-Determinazzjonijiet Analitiċi u l-Kejliet.

34. Għandha ssir analiżi kimika tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test qabel ma jibda t-test sabiex tiġi vverifikata l-konformità mal-kriterji ta' aċċettazzjoni. L-irreprikati kollha għandhom jiġu analizzati għalihom fil-bidu u fi tmiem it-test. Tal-inqas darba fil-ġimgħa għandu jiġi analizzat irreprikat wieħed għal kull konċentrazzjoni tat-test matul it-test, b'bidla sistematika bejn l-irreprikati (1,2,3,4,1,2 ...). Jekk il-kampjuni jinħażnu sabiex jiġu analizzati iktar tard, il-metodu ta' hżin tal-kampjuni għandu jiġi vvalidat minn qabel. Il-kampjuni għandhom jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' daqs ta' 0,45 μ m tal-pori) jew iċċentrifugati sabiex jiġi żgurat li jsiru determinazzjonijiet fuq is-sustanza kimika f'soluzzjoni vera.
35. Matul it-test, l-ossigenu dissolt, il-pH, l-ebusija totali, il-konduttività, is-salinità (jekk relevanti), u t-temperatura għandhom jitkejlu fil-kompartimenti kollha tat-test. Tal-inqas, l-ossigenu dissolt, is-salinità (jekk relevanti), u t-temperatura għandhom jitkejlu kull ġimgħa, u l-pH, il-konduttività u l-ebusija fil-bidu u fi tmiem it-test. Ideallment, it-temperatura għandha tittejjel kontinwament f'tal-inqas kompartment wieħed tat-test.
36. Ir-riżultati għandhom ikunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejlin. Madankollu, jekk il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni tinżamm b'mod sodisfaċenti fi hdan ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali tul it-test shih, f'dak il-każ ir-riżultati jistgħu jkunu bbażati fuq valuri nominali jew inkella mkejlin.

Osservazzjonijiet u kejliet*Stadju tal-iżvilupp embrijoniku*

37. L-espożizzjoni għandu jibda malajr kemm jista' jkun wara l-fertilizzazzjoni u qabel tibda l-qasma blastodiska u mhux iktar minn 12-il siegħa wara l-fertilizzazzjoni sabiex tiġi żgurata espożizzjoni matul l-iżvilupp embrijoniku bikri.

Tifqis u sopravivenza

38. Osservazzjonijiet fuq it-tifqis u s-sopravivenza għandhom isiru tal-inqas darba kuljum u n-numri jridu jiġu rreġistrati. Embrijuni, larva u hut żgħir mejjin għandhom jitnehhew malli jiġu osservati peress li jistgħu jitmermu malajr u jistgħu jiġu disaggregati skont l-azzjonijiet tal-hut l-iehor. Għandha tingħata attenzjoni kbira meta jitnehhew l-individwi mejjin sabiex ma jintlaqtux u lanqas ma ssir ħsara fiżika fuq bajd/larva fil-qrib, peress li dawn huma estremament delikati u sensitivi. Il-kriterji għall-mewt iwarjaw skont l-istadju tal-ħajja:

— għall-bajd: b'mod partikolari fl-istadji bikrin, telf qawwi fit-transluċenza u l-bidla fil-kolorazzjoni, ikkaġunat minn koagolazzjoni u/jew preċipitazzjoni tal-proteina, li jwasslu għal dehra opaka bajda;

▼ M6

- għal larva u ħut żgħir: immobilità u/jew nuqqas ta' ċaqliq respiratorju u/jew nuqqas ta' tahbit il-qalb u/jew kolorazzjoni opaka bajda tas-sistema nervuża ċentrali u/jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimoli mekkaniċi.

Dehra anormali

39. In-numru ta' larva jew ħut li juri anormalità fil-forma tal-ġisem għandu jiġi rreġistrat, u d-dehra u l-ghamla tal-anormalità deskritta. Ta' min jinnota li embrijuni u larva anormali jsejnhu b'mod naturali u jistgħu jkunu fl-ordni ta' perċentwal kbir fil-kontroll(i) f'ċerti speċijiet. Annimali anormali għandhom jitnehhew biss mill-kompartimenti tat-test meta jmutu. Madankollu, 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, jekk l-anormalitajiet jirriżultaw f'uġigh, tbatija u diffikultà jew hsara dejjiema, u l-mewt tista' titbassar b'mod affidabbli, l-annimali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati skont id-deskrizzjoni fil-paragrafu 44 u ttrattati bħala mortalità għall-analiżi tad-dejta.

Imġiba anormali

40. Anormalitajiet, eż. iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, trankwillità atipika u mġiba atipika tat-tmiġ għandhom jiġu rreġistrati malli jidhru.

Piż

41. Fi tmiem it-test, il-ħut kollu li jkun għadu ħaj għandu jiġi ewtanizzat (anestetizzat jekk għandhom jittiehdu kampjuni tad-demem), u għandu jintiżen il-piż imxarrab individwali (imnixxef bit-taptip).

Tul

42. Fi tmiem it-test, għandu jitkejjel it-tul individwali (tul standard).
43. Dawn l-osservazzjonijiet ser jirriżultaw fid-dejta kollha li ġejja jew parti minnha disponibbli għar-rapportar:

- il-mortalità kumulattiva;
- in-numri ta' ħut b'saħħtu fi tmiem it-test;
- iż-żmien sal-bidu tat-tifqis u tmiem it-tifqis;
- it-tul u l-piż tal-annimali li għadhom ħajjin;
- in-numri ta' larva sfigurata;
- in-numri ta' ħut li jesibixxi mġiba anormali.

Kampjunar tal-ħut

44. Il-kampjunar tal-ħut isir fi tmiem it-test. Il-ħut fil-kampjun għandu jiġi ewtanizzat b'eż. MS-222 (100-500 mg għal kull l ibbaferjat b'200 mg NaHCO₃ għal kull l) jew FA-100 (4-allil-2-metossifenol: ewġenol) u jitkejjel u jintiżen bħala piż nett (imnixxef bit-taptip) jew anestetizzat jekk għandu jittiehed kampjun tad-demem (ara l-paragrafu 49).

Kampjunar għall-analiżi tal-VTG u determinazzjoni tas-sess permezz ta' evalwazzjoni istoloġika

45. Il-ħut kollu għandu jiġi kampjunat u jithejja għal analiżi tas-sess u l-VTG. Il-ħut kollu għandu jiġi analizzat istikoloġikament sabiex jiġi ddeterminat is-sess. Għall-kejl tal-VTG, huwa aċċettat subkampjunar ta' tal-inqas 16-il

▼ **M6**

huta minn kull irreplikant. Għandu jiġi analizzat iktar ħut għall-VTG jekk ir-riżultati tas-subkampjunar ma jkunx ċar.

46. Il-proċedura ta' kampjunar għall-VTG u l-istabbiliment tas-sess jiddependu mill-metodu ta' analiżi tal-VTG:

Metodu tal-omoġenat tar-ras/tad-denb għal analiżi tal-VTG

47. Il-ħut huwa ewtanizzat. Ir-ras u d-denb ta' kull ħuta huma sseparati mill-ġisem tal-ħut permezz ta' qatgħat li jsiru eżatt wara l-pinen pettorali, u eżatt wara l-pinna dorsali, bl-użu ta' sikkinka kirurġika (Ara l-Figura 1). Il-parti tar-ras u d-denb minn kull ħuta jingabru flimkien, jintiżnu u jingħataw numru individwali, jiġu ffrizati f'nitroġenu likwidu u jinħażnu f' -70° jew inqas għala analiżi tal-VTG. Il-parti tal-ġisem tal-ħut tingħata numru u tiġi stabbilita f'fissattiv xieraq għal evalwazzjoni istoloġika (22). Bl-użu ta' dan il-metodu, il-VTG u l-istopatoloġija jiġu evalwati fuq kull individwu u, b'hekk, bidla possibbli fil-livell tal-VTG tista' tkun relatata mas-sess fenotipiku tal-ħut jew is-sess ġenetiku (il-medaka Ġappuniża u l-ispinarell) tal-ħut. Għal iktar informazzjoni, ara l-gwida għall-omoġenizzazzjoni (Appendiċi 5) u gwida għall-kwantifikazzjoni tal-VTG (Appendiċi 6).

Metodu ta' omoġenat tal-fwied għal analiżi tal-VTG

48. Il-ħut jiġi ewtanizzat. Il-fwied jinqata' u jinħażen f' -70 °C jew inqas. Il-proċeduri rrakkomandati għal qtugħ tal-fwied u pretrattament huma disponibbli fit-TG 229 tal-OECD (37) jew il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness (38). Imbagħad, il-fwied jiġi omoġenizzat b'mod individwali kif deskritt fit-TG 229 tal-OECD jew il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness. Is-supernatant migħbur jintuża għall-kejl tal-VTG b'teknika ELISA omologa (ara l-Appendiċi 6 għal eżempju ta' kwantifikazzjoni fiż-żebra jew it-TG 229 tal-OECD (37) għal medaka Ġappuniża). Skont dan l-approċċ, huwa possibbli wkoll li jkun hemm dejta tal-ħut individwali kemm fuq il-VTG kif ukoll l-istoloġija tal-gonadi.

Il-metodu tal-plażma tad-demm għal analiżi tal-VTG

49. Id-demm jingabar mill-ħut anestetizzat b'titqib kardijaku, vina kawdali jew qtugħ tad-denb, u jiġi ċcentrifugat f'4 °C għall-ġbir tal-plażma. Il-plażma tinħażen f'70 °C jew inqas sal-użu. Il-ħut shiħ jiġi ewtanizzat u f'fissat għal istoloġija. Kemm il-kampjuni tal-plażma kif ukoll il-ħut jingħataw numru individwali sabiex il-livelli tal-VTG jiġu relatati mas-sess tal-ħut.

Figura 1

Kif taqta' ħuta għall-kejl tal-VTG fl-omoġenat tar-ras/tad-denb u l-evalwazzjoni istoloġika tas-sezzjoni tan-nofs



▼ M6

Determinazzjoni tas-sess ġenetiku

50. Jittiehed kampjun bijoloġiku għad-determinazzjoni tas-sess ġenetiku minn huta individwali fi speċijiet li għandhom markaturi xierqa. Għal medaka Gappuniża, tingabar il-pinna anali jew dorsali. Tinghata deskrizzjoni ddet-taljata fl-Appendiċi 9 inkluż il-kampjunar tat-tessut u d-determinazzjoni tas-sess b'metodu tal-PCR. Bl-istess mod, għall-ispinarella, fl-Appendiċi 10 tinghata deskrizzjoni tal-kampjunar tat-tessuti u metodu tal-PCR li jistabbilixxi s-sess.

Kejl tal-VTG

51. Il-kejl tal-VTG għandu jkun ibbażat fuq metodu kwantitattiv u analitikament ivvalidat. L-informazzjoni għandha tkun disponibbli fuq il-varjabbiltà intrassaġġ u interassaġġ tal-metodu użat fl-laboratorju partikolari. Is-sors tal-varjabbiltà interlaboratorja u intralaboratorja hija (ferm probabbli) ibbażata fuq l-istadji differenti tal-iżvilupp tal-popolazzjoni tal-hut. Minhabba l-varjabbiltà tal-kejl tal-VTG, l-NOECs ibbażati fuq dan il-punt ta' tmiem wahdu għandhom jiġu ttrattati bil-galbu. Hemm disponibbli metodi differenti sabiex tiġi vvalutata l-produzzjoni tal-VTG fl-ispeċijiet tal-hut ikkunsidrati f'dan l-assaġġ. Teknika ta' kejl li hija kemm relattivament sensittiva u speċifika hija d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tal-proteini permezz tal-assaġġ tal-immunosorbenti marbutin mal-enżimi (ELISA). Għandhom jintużaw antikorp omologi (imrobbijin kontra l-VTG tal-istess speċijiet) u l-iktar standards importanti tal-omologi.

Determinazzjoni tas-sess

52. Skont il-proċedura ta' kampjunar tal-VTG, hut shih jew is-sezzjoni tan-nofs li jifdal ta' kull huta jitqieghdu f'kaxxetta ta' pproċessar ittikkettata minn qabel u jiġu ffissati f'fissattiv xieraq għad-determinazzjoni istoloġika tas-sess (dan jista' jsir ukoll għall-evalwazzjoni tas-sejbien tal-istadju tal-gonadi). Gwida dwar l-iffissar u l-inkorporazzjoni hija pprovduta fl-Appendiċi 7 kif ukoll fl-“OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads” (22). Wara l-ipproċessar, il-hut jiġi inkorporat fi blokk tal-paraffina. L-individwi għandhom jitqieghdu b'mod longitudinali fil-blokka tal-paraffina. Minn kull individwu jittiehdu minimu ta' sitt sezzjonijiet longitudinali (hxuna ta' 3-5 µm) fi pjann frontali inkluż tessut gonadali miż-żewġ gonadi. L-intervall bejn dawn is-sezzjonijiet għandu jkun ta' madwar 50 µm għall-irġiel u 250 µm għan-nisa. Madankollu, peress li spiss kull blokk ser ikun fiha rġiel u nisa (jekk iktar minn individwu wiehed jiġi inkorporat f'kull blokk), l-intervall ta' bejn is-sezzjonijiet minn dawn il-blokk għandu jkun ta' madwar 50 µm sakem jinkisbu tal-inqas sitt sezzjonijiet tal-gonadi minn kull raġel. Wara, l-intervall bejn is-sezzjonijiet jista' jiddided għal madwar 250 µm għan-nisa. Is-sezzjonijiet jittebbghu b'ematossilina u eozina u jiġu eżaminati b'mikroskopju ħafif b'enfasi fuq is-sess (irġiel, nisa, intersess jew mhux differenzjati). L-interess huwa ddefinit bħala preżenza ta' iktar minn ooċita wahda f'testikolu għal kull sitt sezzjonijiet analizzati jew ċelloli spermatogeniċi (iva/le) fl-ovarji. L-istopatoloġija u s-sejbien tal-istadju tal-ovarji u t-testikoli mhumix obbligatorji iżda jekk jiġu investigati, ir-riżultati għandhom jiġu analizzati statistikament u rrapportati. Ta' min jinnota li fin-natura tagħhom ċerti speċijiet tal-hut ma għandhomx par żviluppat ta' gonadi u jista' jkun hemm gonada wahda (eż. il-medaka Gappuniża u kultant iż-żebra). Dawn l-osservazzjonijiet kollha għandhom jiġu rreġistrati.

53. Id-determinazzjoni tas-sess ġenetiku f'edaka Gappuniża individwali hija bbażata fuq il-preżenza jew l-assenza tal-ġene ta' determinazzjoni tas-sess maskili tal-medaka, id-DMY, li jinsab fuq il-kromożoma Y. Is-sess ġenotipiku tal-medaka jista' jiġi identifikat b'sekwenzjar tal-ġene DMY mid-DNA

▼ **M6**

estratt minn, pereżempju, biċċa pinna anali jew dorsali. Il-preżenza tad-DMY tindika individwu (raġel) XY indipendentement mill-fenotip, filwaqt li n-nuqqas ta' DMY jindika individwu XX (mara) indipendentement mill-fenotip (23). Fl-Appendiċi 9 tinghata gwida għat-thejjija tat-tessuti u l-metodu tal-PCR. Id-determinazzjoni tas-sess ġenetiku fl-ispinarell issir bil-metodu ta' PCR ukoll, deskritt fl-Appendiċi 10.

54. L-okkorrenza ta' interess (għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 1) għandha tiġi rrapportata.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

55. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji huma taħt kontroll endokrinali fi speċijiet bħall-medaka Ġappuniża; għaldaqstant, l-osservazzjonijiet tad-dehra fiżika tal-hut għandhom isiru fi tmiem l-espożizzjoni, jekk dan ikun possibbli. Fil-medaka Ġappuniża, il-formazzjoni papillari fuq il-parti ta' wara tal-pinna anali fin-nisa hija sensittiva għall-androġeni. Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness (38) jipprovdi ritratti rilevanti tal-karatteristiċi sesswali sekondarji tal-irġiel u n-nisa androġenizzati.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

56. Importanti li l-iktar test statistiku validu b'saħħtu jistabbilixxi l-punt ta' tmiem. L-irreplikati huwa l-unità sperimentali iżda l-varjabbiltà intrarreprikati għandha tkun inkluża fl-ittestjar statistiku. Flow-chart tad-deċiżjonijiet hija disponibbli fl-Appendiċi 8 biex tgħin fl-iktar test statistiku xieraq li għandu jintuża fuq il-bażi tal-karatteristika tad-dejta miksuba mit-test. Il-livell ta' importanza statistika huwa ta' 0,05 għall-punti ta' tmiem kollha inklużi.

Proporzjonijiet tas-sess u s-sess ġenetiku.

57. Il-proporzjonijiet tas-sess għandhom jiġu analizzati għal effett sinifikanti (approċċ tal-NOEC/LOEC) tal-espożizzjoni b'(test tax-xejriet) Jonckheere-Terpstra jekk jeżisti doża-rispons monotonu. Jekk tinstab nonmonotonicità, f'dak il-każ għandu jiġi applikat pair wise test: Uża t-test ta' Dunnett jekk jistgħu jinkisbu normalità u varjanza omogenea. Uża Tamhane-Dunnett jekk tkun preżenti varjanza eterogenea. Inkella uża test eżatt ta' Mann-Whitney b'agġustament ta' Bonferroni-Holm. Fl-Appendiċi 8 hemm flow chart li tid-deskrivi l-istatistiki tal-proporzjonijiet tas-sess. Il-proporzjonijiet tas-sess għandhom jiġu ppreżentati f'tabelli bħala proporzjonijiet tal-konċentrazzjoni $\pm$ SD ta' rġiel, nisa, interess u mhux differenzjati. Għandu jinxtehet dawl fuq is-sinifikat statistika. L-eżempji huma ppreżentati fir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42). Is-sess ġenetiku għandu jiġi rrapportat bħala percentwal tal-bidla lura tas-sess fenotipiku ta' rġiel, nisa, intersess u mhux differenzjati.

Konċentrazzjonijiet tal-VTG

58. Il-konċentrazzjonijiet tal-VTG għandhom jiġu analizzati għal effett sinifikanti (approċċ tal-NOEC/LOEC) tal-espożizzjoni. It-test ta' Dunnett huwa ppreferut iktar mit-test-t bil-korrezzjoni ta' Bonferroni. Meta tintuża korrezzjoni Bonferroni, aħjar tintuża l-korrezzjoni ta' Bonferroni-Holm. Għandu jiġi pprovdut għal log-trasformazzjoni tal-VTG sabiex jinkisbu normalità u omogeneità tal-varjanza. Imbagħad, jekk il-konċentrazzjoni-rispons ikun konsistenti ma' monotonicità, f'dak il-każ aħjar jintuża t-test ta' Jonckheere-Terpstra u mhux dawk imsemmijin iktar 'il fuq. Jekk jintużaw it-testijiet-t jew it-test ta' Dunnett, ma hemmx bżonn ta' test-F ANOVA ta' sinifikanza biex wiehed jipproċedi. Għad-dettalji, ara l-flow-chart fl-Appendiċi 8. Ir-riżultati għandhom jiġu rrapportati f'tabelli bħala medji tal-konċentrazzjoni

▼ **M6**

$\pm$ SD għal irġiel, nisa, intersess u mhux differenzjati b'mod separat. Għandu jinxtehet dawl fuq is-sinifikanza statistika għal nisa fenotipiċi u rġiel fenotipiċi. L-eżempji huma ppreżentati fir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42).

Konċentrazzjonijiet propji tas-sustanza kimika tat-test

59. Il-konċentrazzjonijiet propji tal-kompartiment tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu analizzati fil-frekwenzi deskritti fil-paragrafu 34. Ir-riżultati għandhom jiġu rrapportati f'tabelli bħala konċentrazzjoni medja $\pm$ SD fuq bażi tal-irreplikati kif ukoll fuq il-bażi tal-konċentrazzjoni b'enfasi fuq l-informazzjoni dwar in-numru ta' kampjuni u b'outliers mill-konċentrazzjoni medja tat-trattament $\pm$ 20 %. L-eżempji jistgħu jinkisbu mir-rapport ta' validazzjoni tal-Fażi 2 tal-FSDT (42).

Interpretazzjoni tar-riżultati

60. Ir-riżultati tat-test għandhom jiġu interpretati bil-galbu meta l-konċentrazzjonijiet imkejlin tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test isehhu f'livelli qrib il-limitu ta' identifikazzjoni tal-metodu analitiku.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test

- Il-karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti; identifikazzjoni tas-sustanza kimika, dejta li tinkludi l-purità u l-metodu analitiku għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test

- Il-proċedura tat-test użata (eż. tiġdid/semistatiku bi fluss kontinwu); id-disinn tat-test għandu jinkludi konċentrazzjonijiet tat-test, il-metodu ta' thejjija tas-soluzzjonijiet ewlenin (f'Anness), il-frekwenza tat-tiġdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);
- Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejlin u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fil-kompartimenti tat-test u l-metodu li bih inkisbu (il-metodu analitiku użat għandu jiġi ppreżentat f'Anness); Evidenza li l-kejl jirreferu għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;
- Il-kwalità tal-ilma fi hdan il-kompartimenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt;
- Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmiġħ (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza u l-analiżijiet għall-kontaminanti (eż. il-PCBs, il-PAHs u l-pestiċidi organokloru) jekk rilevanti.

Riżultati

- Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji dwar il-validità: dejta dwar ir-rata ta' tifqis għandha tiġi ppreżentata f'tabelli bħala perċentwal għal kull irreplikant u għal kull konċentrazzjoni. L-outliers mill-kriterji ta' aċċettazzjoni (fil-kontrolli) għandhom jiġu enfasizzati. Is-sopravivenza għandha tiġi ppreżentata bħala perċentwal għal kull irreplikant u għal kull konċentrazzjoni. L-outliers mill-kriterji tal-validità (fil-kontrolli) għandhom jiġu enfasizzati;
- Indikazzjoni ċara tar-riżultati miksubin fuq il-punti ta' tmiem differenti osservati: sopravivenza u tifqis b'suċċess tal-embrijuni; anomalitajiet esterni; tul u piż; kejl tal-VTG (ng/g omoġenat, ng/ml plażma jew

▼ **M6**

ng/mg fwied); istologija tal-gonadi, proporzjon tas-sessi, dejta dwar is-sess genetiku; inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-hut u kwalunkwe effett vizibbli prodott mis-sustanza kimika tat-test.

62. Ir-riżultati għandhom jiġu ppreżentati bħala valur medji $\pm$ devjazzjoni standard (SD) jew żball standard (SE). L-istatistiki għandhom jiġu rrapportati tal-inqas bħala NOEC u LOEC u intervalli ta' kunfidenza. Għandha tiġi segwita l-flow-chart statistika (Appendiċi 8).

LETTERATURA

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, "Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R. van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), "An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), "Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), "Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors", *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.
- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), "Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), "Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), "Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), "Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus*

▼ M6

- aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction”, *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), “Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka”, *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), “Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*”, 78, pp. 202-206.
- (16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), “Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- (17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), “Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Nordic Council of Ministers, TemaNord* 2001:597, pp. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), “Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), “Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- (20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), *Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish*, *Sexual Development* 3, pp. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), “An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), “Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*”, *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.
- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), “Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations”, *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), “Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), “Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethinylestradiol added to a whole lake”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), “Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.

▼ **M6**

- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), "Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), "Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disruptors: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)", *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), "Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), "Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- (34) Il-Kapitolu C.14 ta' dan l-Anness, Test tat-Tkabbir tal-Hut Żghir.
- (35) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, Bijodegradabilità Lesta.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (38) Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Hut ta' 21 Jum: A Short Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- (40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), "Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*" *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.
- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
- (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
- (44) 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. ĠU L 276, 20.10.2010, p. 33.

▼ **M6***Appendiċi 1***Abbrevjazzjonijiet u definizzjonijiet**

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkaguna effett fil-livell tal-popolazzjoni

ASV: Valur ta' saturazzjoni tal-arja

Bijomarkatur: Li jikkaguna effett fil-livell individwali

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita.

Dph: Jiem wara t-tifqis

DMY: Ġene tad-dominju DM speċifiku għall-Y mehtieg għall-iżvilupp tal-irġiel fil-hut medaka

ELISA: Assaġġ tal-Immunosorbent Marbut mal-Enżimi

Piż tal-hut: Piż imxarrab tal-hut (imnixxef bit-taptop)

FSDT: Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Hut

Assi tal-HPG: Assi ipotalamiku-pitwitarju-gonadali

Hut intersess: Hut b'iktar minn ooċita wahda fit-testikoli għal kull 6 sezzjonijiet analizzati jew ċelloli spermatogēniċi fl-ovarji (iva/le)

Rata tat-tagħbija: Piż imxarrab tal-hut għal kull volum ta' ilma

MOA: Modalità ta' azzjoni

RT-PCR: Reazzjoni Katina tal-Polimerazi tat-Transkriptaži Rigrassiva

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata li tuża dan il-metodu ta' ttestjar.

Hut mhux differenzjat: Hut b'gonadi li ma jesibixxu ebda ċellula ġerminali dixerribbli.

VTG: Vitelloġenina

▼ M6

Appendiċi 2

Kundizzjonijiet sperimentali għall-FSDT (speċijiet tal-ilma helu)

1. Speċijiet irakkomandati	Medaka Ġappuniża (<i>Oryzias latipes</i>)	Žebra (<i>Danio rerio</i>)	Spinarell (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Tip tat-test	Bi fluss kontinwu jew semistatiku	Bi fluss kontinwu jew semistatiku	Bi fluss kontinwu jew semistatiku
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa')
5. Intensità tad-dawl	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu	12-16-il siegħa dawl, 8-12-il siegħa dlam	12-16-il siegħa dawl, 8-12-il siegħa dlam	16-il siegħa dawl, 8 siegħa dlam
7. Daqs minimu tal-kompartiment	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l	Il-kompartimenti individwali għandu jkun fihom volum minimu tal-ilma ta' 7 l
8. Skambji tal-volumi tas-soluzzjonijiet tat-test	Tal-inqas 5 kuljum	Tal-inqas 5 kuljum	Tal-inqas 5 kuljum
9. Età tal-organizmi tat-test fil-bidu tal-espożizzjoni	Bajd iffertilizzat ġdid (Stadju bikri tal-blastula)	Bajd iffertilizzat ġdid (Stadju bikri tal-blastula)	Bajd iffertilizzat ġdid
10. Nru ta' bajd għal kull trattament	Tal-inqas 120	Tal-inqas 120	Tal-inqas 120
11. Nru ta' trattamenti	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)	Tal-inqas 3 (kif ukoll kontrolli xierqa)
12. Nru ta' rreplikati għal kull trattament	Tal-inqas 4 (hlief f'każ ta' allokazżjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)	Tal-inqas 4 (hlief f'każ ta' allokazżjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)	Tal-inqas 4 (hlief f'każ ta' allokazżjoni tal-għerq kwadrat għall-kontrolli)
13. Reġim tat-tmiġh	<i>Artemia</i> hajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmiġh darbtejn kuljum	Ikel speċjali għall-hut żgħir, <i>Artemia</i> hajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmiġh darbtejn kuljum	<i>Artemia</i> hajjin, gamblu tas-salmura adult iffriżat, ikel imsaffaf, eċċ. Huwa rrakkomandat tmiġh darbtejn kuljum
14. Għoti tal-arja	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 60 %	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 60 %	Xejn sakemm il-konċentrazzjonijiet tad-DO ma jaqgħux f'livell ta' saturazzjoni inqas minn 70 %

▼ M6

15. Ilma ta' dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit nadif
16. Durata tal-espożizzjoni għas-sustanza kimika tat-test	60-dph	60-dph	60-dph
17. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	Suċċess tat-tifqis, morfologija Gross tas-Sopravivenza, VTG istologija tal-gonadi, Sess genetiku Proporzjon tas-sessi	Suċċess tat-tifqis, Sopravivenza Morfoloġija gross, VTG istologija tal-gonadi, Proporzjon tas-sessi	Suċċess tat-tifqis, Sopravivenza Morfoloġija gross, VTG istologija tal-gonadi, Proporzjon tas-sessi
18. Kriterji tal-aċċettabilità tat-test għall-irreplikati kollettivi tal-kontrolli	Suċċess tat-tifqis > 80 %	Suċċess tat-tifqis > 80 %	Suċċess tat-tifqis > 80 %
	Sopravivenza wara t-tifqis $\geq$ 70 % tkabbir	Sopravivenza wara t-tifqis $\geq$ 70 % tkabbir	Sopravivenza wara t-tifqis $\geq$ 70 % tkabbir
	(Piż imxarrab tal-hut, imnixxef bit-taptip) > 150 mg	(Piż imxarrab tal-hut, imnixxef bit-taptip) > 75 mg	(Piż imxarrab tal-hut, imnixxef bit-taptip) > 120 mg
	Tul (tul standard) > 20 mm	Tul (tul standard) > 14 mm	Tul (tul standard) > 20 mm
	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70 %	Proporzjon tas-sessi (% irġiel jew nisa) 30 %-70 %

▼ **M6***Appendiċi 3***Karatteristiċi kimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli**

KOSTITWENT	KONĊETRAZZJONI
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg /l
Kloru residwu	< 10 µg /l
Pestiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

▼ **M6***Appendiċi 4***Mill-metodu ta' ttestjar C.14 /gwida dwar il-konċentrazzjonijiet tat-test**

Kolonna (Numru ta' konċentrazzjonijiet bejn 100 u 10 jew bejn 10 u 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Minn kolonna tista' tingħażel sensiela ta' tliet konċentrazzjonijiet suċċessivi (jew iktar). Il-punti tan-nofs bejn il-konċentrazzjonijiet fil-kolonna (x) jinsabu fil-kolonna ($2x + 1$). Il-valuri elenkati jistgħu jirrappreżentaw konċentrazzjonijiet mogħtijin bħala percentwal għal kull volum jew piż (mg/l jew µg/l). Il-valuri jistgħu jiġu mmultiplikati jew jiġu diviżi bi kwalunkwe power ta' 10 kif xieraq. Tista' tintuża l-kolonna 1 jekk kien hemm inċertezza konsiderevoli fuq il-livell tat-tossicità.

▼ M6

Appendiċi 5

Gwida għall-omoġenizzazzjoni tar-ras u d-denb minn żebra, karpjun buras, spinarell u medaka ġappuniża żgħar

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri li jseħhu qabel ma tiġi kkwantifikata l-konċentrazzjoni tal-VTG. Jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jirriżultaw fi kwantifikazzjoni paragunabbli tal-VTG. Tista' tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tad-demem jew il-fwied minflok l-omoġenat tar-ras/tad-denb.

Proċedura

1. Il-hut huwa anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.
2. Ir-ras u d-denb jinqatgħu skont id-deskrizzjoni tat-test. **Importanti:** L-istrumenti kollha ta' dissezzjoni, u l-injama tal-qtugħ għandhom jitlahaħlu u jitnaddfu sew (eż. b'etanol 96 %) bejn it-tqandil ta' kull ħuta individwali sabiex jiġi evitat "tniġġis tal-VTG" minn nisa jew irġiel indotti għal irġiel mhux indotti.
3. Il-piż tar-ras u d-denb kollettivi minn kull ħuta jitkejjel sal-eqreb mg.
4. Wara li jintiżnu, il-partijiet jitqiegħdu f'tubi xierqa (eż. eppendorf 1,5 ml) u jiġu ffrizati f'— 80 °C sal-omoġenizzazzjoni jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistils tal-plastik. (Jistgħu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). **Importanti:** *It-tubi għandu jkollhom in-numru xieraq sabiex ir-ras u d-denb mill-ħuta jkunu jistgħu jiġu rrelatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istologija tal-gonadi.*
5. Meta tinkiseb massa omoġena jiżdied ammont ta' 4-10 darbiet il-piż tat-tessut ta' **bafer ta' omoġenizzazzjoni (*)** kiesaħ silġ (hu nota tad-dilwizzjoni). Ibqa' aħdem bil-pistils sakemm it-tahlita tiġi omoġena. **Nota importanti:** *Għal kull ħuta jintużaw pistils godda.*
6. Il-kampjuni jitqiegħdu fis-silġ saċ-ċentrifugazzjoni f'4 °C f'50 000 g għal 30 min.
7. Uża pipetta biex tiddistribwixxi porzjonijiet ta' 20 sa 50 µl (hu nota tal-ammont) supernatant f'**tal-inqas żewġ** tubi billi tbill il-ponta tal-pipetta taht is-saff ta' xaham tal-wiċċ u billi tiġbed bil-galbu s-supernatant mingħajr xaham- jew frazzjonijiet ta' gerbub.
8. It-tubi jinħażnu f'— 80 °C sakemm jintużaw.

(*) Bafer ta' omoġenizzazzjoni

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Tahlita tal-inibitur tal-proteazi (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Tahlita tal-inibitur tal-proteazi (jew tahlitiet tal-inibitur tal-proteazi ekwivalenti).
 TRIS: TRIS-ULTRA PUR (ICN)
 Tahlita tal-inibitur tal-proteazi: Mis-Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott **P 8340**.

Nota: Il-bafer ta' omoġenizzazzjoni għandu jintuża dak inhar tal-manifattura tiegħu. Qiegħdu fuq is-silġ matul l-użu.

▼ **M6***Appendiċi 6***Gwida għall-kwantifikazzjoni tal-vitellogenina tal-omoġenat tar-ras u d-denb fiż-żebra (*Danio rerio*) (immodifikata minn Holbech et al., 2001). jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jużaw standards u antikorpi omologi**

1. Il-platti tal-mikrotiter (Maxisorp F96 iċċertifikat, Nunc, Roskilde id-Danimarka) miksijin minn qabel b'5 µg/ml lipovitellina-IgG antiżebra jithallew joqogħdu u jinhaslu tliet darbiet b'bafer tal-ħasil (*).
2. Il-vitellogenina ppurifikata standard taż-żebra ⁽¹⁾ tiġi dilwita b'mod serjali għal 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 u 20 ng/ml f'bafer ta' dilwizzjoni (**) u l-kampjuni jiġu dilwiti tal-inqas 200 darba (sabiex jiġi evitat effett matrici) f'bafer ta' dilwizzjoni u tiġi applikata għall-platti. Jiġi applikat kontroll tal-assaġġ f'duplikat. Jiġu applikati 150 µl f'kull toqba. L-istandards huma applikati fid-duplikat u l-kampjuni fi triplikat. Inkubahom tul il-lejl f'4 °C fuq xejker.
3. Il-platti jinhaslu 5 darbiet b'bafer tal-ħasil (*)
4. HRP akkoppjata ma' katina dextran (eż. AMDEX A/S, id-Danimarka) u antikorpi kkonjugati huma dilwiti f'bafer tal-ħasil; Id-dilwizzjoni propja tvarja skont il-lott u l-età. Jiġu applikati 150 µl għal kull toqba u l-platti jiġu inkubati għal siegħa f'temperatura tal-kamra fuq xejker.
5. Il-platti jinhaslu 5 darbiet b'bafer tal-ħasil u qiegħ il-platti jitnaddaf bil-galbu bl-etanol.
6. F'kull toqba jiġu applikati 150 µl TMB plus (***). Ipproteġi l-platt kontra d-dawl b'fojl tal-landa, u ara l-iżvilupp tal-kulur fuq xejker.
7. Meta l-kurva standard tiġi żviluppata bis-shiħ, l-attività tal-enzima titwaqqaf billi jiżdiedu 150 µl 0,2 M H₂SO₄ f'kull toqba.
8. L-assorbenza titkejje b'450 nm (eż. fuq Molecular Devices Thermomax plate reader). Id-dejta tiġi analizzata fuq is-software assoċjat (eż. Softmax).

(*) Bafer tal-ħasil:

PBS-stock (****)	500,0 ml
BSA	5,0 g
Tween 20	5,0 ml

Aggusta l-pH għal 7,3 u imla sa 5 l b'H₂O millipori. Aħżen f'4 °C.

(**) Bafer ta' dilwizzjoni:

PBS-Stock (****)	100,0 ml
BSA	3,0 g
Tween 20	1,0 ml

Aggusta l-pH għal 7,3 u imla sa 1 l b'H₂O millipori. Aħżen f'4 °C.

(***) TMB plus huwa substrat "lest biex tużah" immanifatturat minn KemEnTec (id-Danimarka). Huwa sensitiv għad-dawl. Aħżen f'4 °C.

⁽¹⁾ Battelle AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)), ippurifikat skont: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8: 385-398.

▼ M6

(****) PBS stock

NaCl	160,0	g
KH ₂ PO ₄	4,0	g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	26,6	g
KCl	4,0	g

Agġusta l-pH għal 6,8 u imla sa 2 l b'H₂O millipori. Aħżen f'temperatura tal-kamra.

▼ **M6***Appendiċi 7***Gwida ghat-thejjija tas-sezzjonijiet tat-tessut għad-determinazzjoni tas-sessi u s-sejbien tal-istadju tal-gonadi**

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddekrivi l-proċeduri li jsejnhu qabel l-evalwazzjoni tas-sezzjonijiet istoloġiċi. Jistgħu jintużaw proċeduri oħrajn li jirriżultaw f'determinazzjoni tas-sessi u sejbien tal-istadji tal-gonadi li huma simili.

Bi ffit eċċezzjonijiet, dawn il-proċeduri huma simili għal medaka Ġappuniża (JMD) u zebra (ZF).

Ewtanażja, Nekropsija, u Fissazzjoni tat-Tessuti*Objettivi:*

1. Jiġi pprovdut għas-sagrifiċċju dinjituż tal-hut.
2. Il-kisba tal-pizijiet u l-kejliet meħtieġa.
3. Evalwazzjoni ta' karatteristiċi sekondarji tas-sessi.
4. Dissezzjoni tat-tessuti għal analiżi tal-VTG.
5. Fissazzjoni tal-gonadi.

Proċeduri:

1. Il-hut għandu jiġi ssagrifikat eżatt qabel in-nekropsija. Għalhekk, sakemm ma jkunx hemm bosta prosetturi disponibbli, ma għandhomx jiġu ssagrifikati diversi hutiet fl-istess hin.
2. Bl-użu ta' xibka b'manku żgħir, huta titneħħa mill-kompartiment sperimentali u tittiehed fiż-żona tan-nekropsija fil-kontenitur tat-trasport.
3. Il-hut jitqiegħed fis-soluzzjoni tal-ewtanażja. Il-hut jitneħħa mis-soluzzjoni meta jieqaf jieh u ma jibqax responsiv għal stimoli esterni.
4. Jittiehed il-piż imxarrab tal-hut.
5. Għat-thejjija tat-tessuti għal analiżi tal-VTG, il-hut jista' jitqiegħed fuq bord tas-sufra fuq il-panċa ta' mikroskopju ta' dissezzjoni.
 - a. Għaž-zebra, ir-ras tinqata' eżatt wara l-pinna pettorali u d-denb jinqata' eżatt wara l-pinna dorsali.
 - b. Għal medaka Ġappuniża, l-addome jinfetħ permezz ta' qatgħa magħmula bil-galbu li testendi tul il-linja tan-nofs ventrali miċ-ċintura pettorali sa punt kranjali sal-anus. Bl-użu ta' forċipi żgħar u mqass żgħir, jitneħħa bil-galbu l-fwied.
6. Il-kampjuni għall-analiżi tal-VTG jitqiegħed f'tubi eppendorf u jiġu ffrizati minnufih f'nitroġenu likwidu.
7. Il-karkassi inkluzi l-gonadi jitqiegħdu f'kaxxetta tat-tessuti tal-plastik immarkata minn qabel, li mbagħad tiġi ttrasferita f'fissattiv ta' Davidson jew Bouin. Il-volum tal-fissattiv għandu jkun tal-inqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. Il-kontenitur tal-fissattiv jithawwad bil-galbu għal hames sekondi sabiex jinqalgħu l-bżieaq tal-arja mill-kaxxetta.
8. a. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson tul il-lejl kollu, u mbagħad l-ghada jiġu ttrasferiti f'kontenituri individwali ta' formalina bbaferjata newtrali ta' 10 %. Il-kontenituri bil-kaxxetti jithalltu bil-galbu għal 5 sekondi sabiex tiġi żgurata penetrazzjoni adegwata tal-formalina fil-kaxxetti.

▼M6

- b. It-tessuti jibqgħu f'fissattiv ta' Bouin għal 24 siegħa, u mbagħad jiġu ttrasferiti f'etanol ta' 70 %.

Ipproċessar tat-Tessuti*Objettivi:*

1. Tessut deidratat għal penetrazzjoni adegwata tal-paraffina.
2. Introduċi l-paraffina fit-tessut sabiex tinżamm l-integrità tat-tessut u jinholoq wiċċ sod għal mikrotomija.

Proċeduri:

3. Il-kaxxetti tat-tessut immarkati jitnehhew mill-formalina/hżin tal-etanol u l-kaxxetti jitqiegħdu fil-basket/basktijiet tal-ipproċessar. Il-basket tal-ipproċessar jiġi kkargat fil-proċessur tat-tessuti.
4. Tingħażel l-iskeda tal-ipproċessar.
5. Meta l-proċessur tat-tessuti jlesti ċ-ċiklu ta' pproċessar, il-basket/basktijiet jista' jiġi ttrasferit fl-istazzjon inkorporata.

Inkorporazzjoni*Objettiv:*

Orjenta l-kampjun kif xieraq f'paraffina ssolidifikata għal mikrotomija.

Proċeduri:

1. Il-basket/basktijiet tal-kaxxetti jitneħħa mill-proċessur u jitghaddas fil-kompartiment ta' quddiem mimli paraffina tal-konsol termali tal-istazzjon ta' inkorporazzjoni jew inkella l-kaxxetti jitqiegħdu f'hiter tal-paraffina separat.
2. L-ewwel kaxxetta li trid tiġi inkorporata mill-kompartiment ta' quddiem tal-konsol termali jew il-hiter tal-paraffina. L-ghatu tal-kaxxetta jitneħħa u jintrema, u t-tikketta tal-kaxxetta tiġi kkontrollata mar-rekords tal-annimali biex jiġu solvuti diskrepanzi potenzjali qabel l-inkorporazzjoni.
3. Tingħażel kaxxa tat-tiswir ta' inkorporazzjoni b'daqs xieraq.
4. Il-kaxxa tat-tiswir tinżamm taħt iż-żennuna tal-konsol tad-distribuzzjoni u timtela' b'paraffina mdewba.
5. Il-kampjun jitneħħa mill-kaxxetta u jitqiegħed fil-paraffina mdewba fil-kaxxa tat-tiswir. Dan jiġi rripetut b'4-8 kampjuni għal kull kaxxa tat-tiswir tal-paraffina. Il-pożizzjoni tal-hut individwali tiġi mmarkata billi l-huta nru 1 titqiegħed f'180 grad mill-huta 2-4/8.
6. Hija meħtieġa paraffina addizzjonali biex ikun kopert il-kampjun.
7. Il-kaxxa tat-tiswir bil-bażi tal-kaxxetta titqiegħed fuq il-platt tat-tkessih tal-kriokonsol.
8. Wara li tissolidifika l-paraffina, il-blokka (jiġifieri l-paraffina mwebbsa li fiha t-tessuti u l-bażi tal-kaxxetta) titneħħa mill-kaxxa tat-tiswir.

Mikrotomija*Objettiv:*

Aqta' u tella' s-sezzjonijiet istoloġiċi għat-tilwin.

Proċeduri:

1. Il-fażi inizjali tal-mikrotomija msejha “facing” issir kif ġej:
 - a. Il-blokka tal-paraffina titqiegħed fiċ-ċokk tal-mikrotoma.
 - b. Iċ-ċokk jitmexxa billi tiddawwar ir-rota tal-mikrotoma u s-sezzjonijiet hoxnin jinqatgħu mill-wiċċ tal-paraffina tal-blokka sakemm is-sikkina tilhaq it-tessuti inkorporati.

▼ M6

- c. Il-hxuna tas-sezzjoni fuq il-mikrotoma hija stabbilita għal bejn 3 — 5 mikroni. Iċ-ċokk jitmexxa u jinqatgħu bosta sezzjonijiet mill-blokka sabiex jitneħħa kwalunkwe oġġett mahlug fuq wiċċ il-qatgħa tat-tessut matul il-qtugħ ta' fuq fuq.
 - d. Il-blokka tista' titneħħa miċ-ċokk u titqiegħed wiċċha 'l isfel fuq is-silġ biex tassorbi t-tessut.
2. Il-fażi li jmiss tal-mikrotoma hija s-sezzjonar finali u t-tluġ tas-sezzjonijiet tat-tessut fuq is-slides. Dawn il-proċeduri jsiru kif ġej:
 - a. Jekk il-blokka tqiegħdet fuq is-silġ, il-blokka titneħħa mis-silġ u tiġi sostitwita fiċ-ċokk tal-mikrotoma.
 - b. Bil-hxuna tas-sezzjoni fuq il-mikrotoma stabbilita għal 3 — 5 mikroni, iċ-ċokk jitmexxa bit-tidwir tar-rota tal-mikrotoma. Is-sezzjonijiet jinqatgħu mill-blokka sakemm tiġi prodotta “zigarella” wahda li jkun fiha tal-inqas sezzjoni aċċettabbli wahda inkluzi l-gonadi. (Skont kif ikun il-bżonn matul is-sezzjonar, il-blokka tista' titneħħa miċ-ċokk, titqiegħed fuq is-silġ biex tixrob it-tessut, u tiġi sostitwita fiċ-ċokk.)
 - c. Is-sezzjonijiet jiġu ggallegġati ċatti fuq wiċċ l-ilma fil-banju tal-ilma. Isir tentattiv biex tal-inqas tinkiseb sezzjoni wahda li ma jkun fiha ebda tikmix u ma jkollha ebda bżiejaq tal-arja maqbudin taħtha.
 - d. Slide tal-mikroskopju titghaddas taht l-ahjar sezzjoni, li tinhareġ mill-ilma bl-użu tas-slide. Dan il-proċess jissejjaħ “tluġ” tas-sezzjoni fuq is-slide.
 - e. It-tliet sezzjonijiet jithejjew għal sett hut. It-tieni u t-tielet sezzjonijiet jittiehdu f'intervalli ta' 50 mikron wara l-ewwel sezzjoni. Jekk il-hut ma jiġix inkorporat bil-gonadi tiegħu fl-istess livell ta' sezzjonar, iridu jsiru iktar sezzjonijiet sabiex jiġi zgurat li jinkisbu tal-inqas sitt sezzjonijiet inkluzi l-gonadi minn kull huta.
 - f. B'pinna li timmarka s-slides, fuq is-slide jiħażżeż in-numru tal-blokka li minnu giet prodotta s-slide.
 - g. Is-slide titqiegħed f'reċipjent tat-tilwin.
 - h. Il-blokka titneħħa miċ-ċokk u titqiegħed wiċċha 'l isfel għall-hzin.

Tilwin, Vetrina għatu, u Tikkettar tas-Slides*Objettivi:*

- Ċappas is-sezzjonijiet għal eżaminazzjoni istopatoloġika
- Issiġilla b'mod permanenti t-tessuti mtellgħin u mlewna.
- Identifika b'mod permanenti s-sezzjonijiet imlewnin b'mod li jippermetti traċ-ċabbiltà shiha.

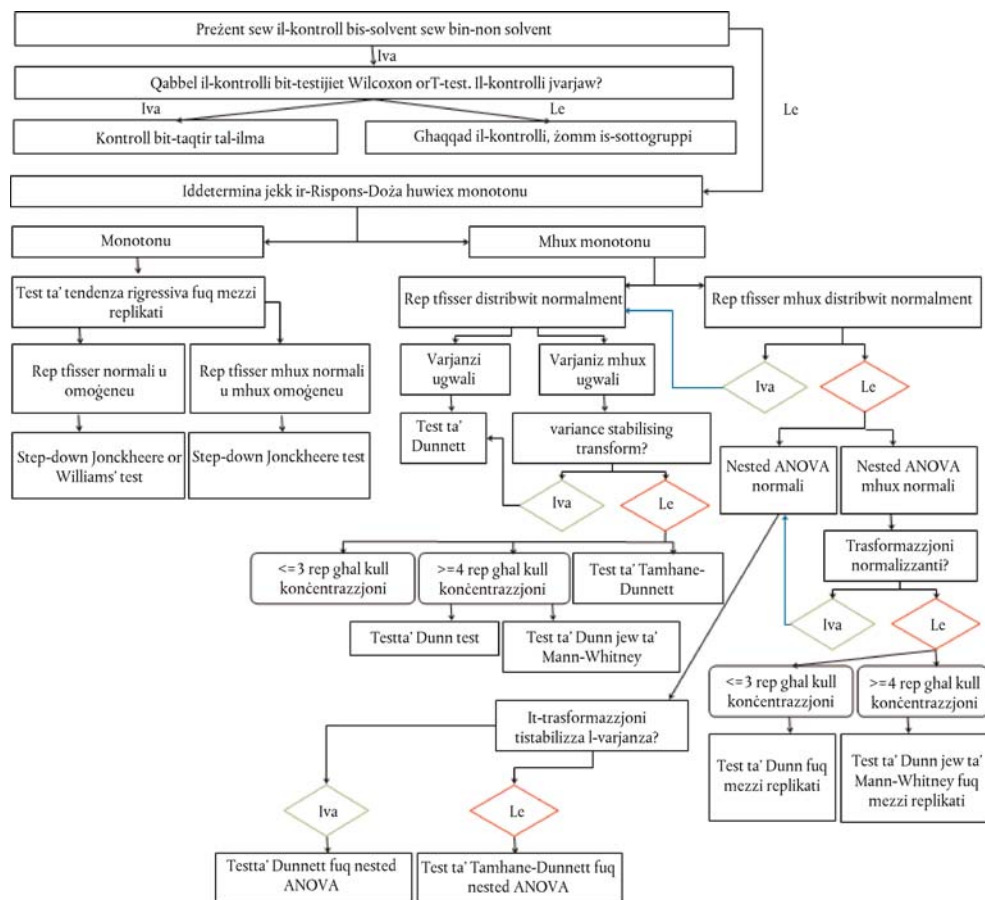
Proċeduri:

1. Tilwin
 - a. Is-slides jitnixxfu bl-arja tul il-lejl qabel jitlewnu.
 - b. Is-sezzjonijiet jiċċappsu b'Ematossilina-Eosina.
2. Vetrina għatu
 - a. Il-vetrini għatu jistgħu jiġu applikati b'mod manwali jew awtomatiku.
 - b. Slide titghaddas fil-ksilen jew TissueClear, u l-ksilen/TissueClear żejjed jitneħħa b'tap tip hafif mill-ġenb.

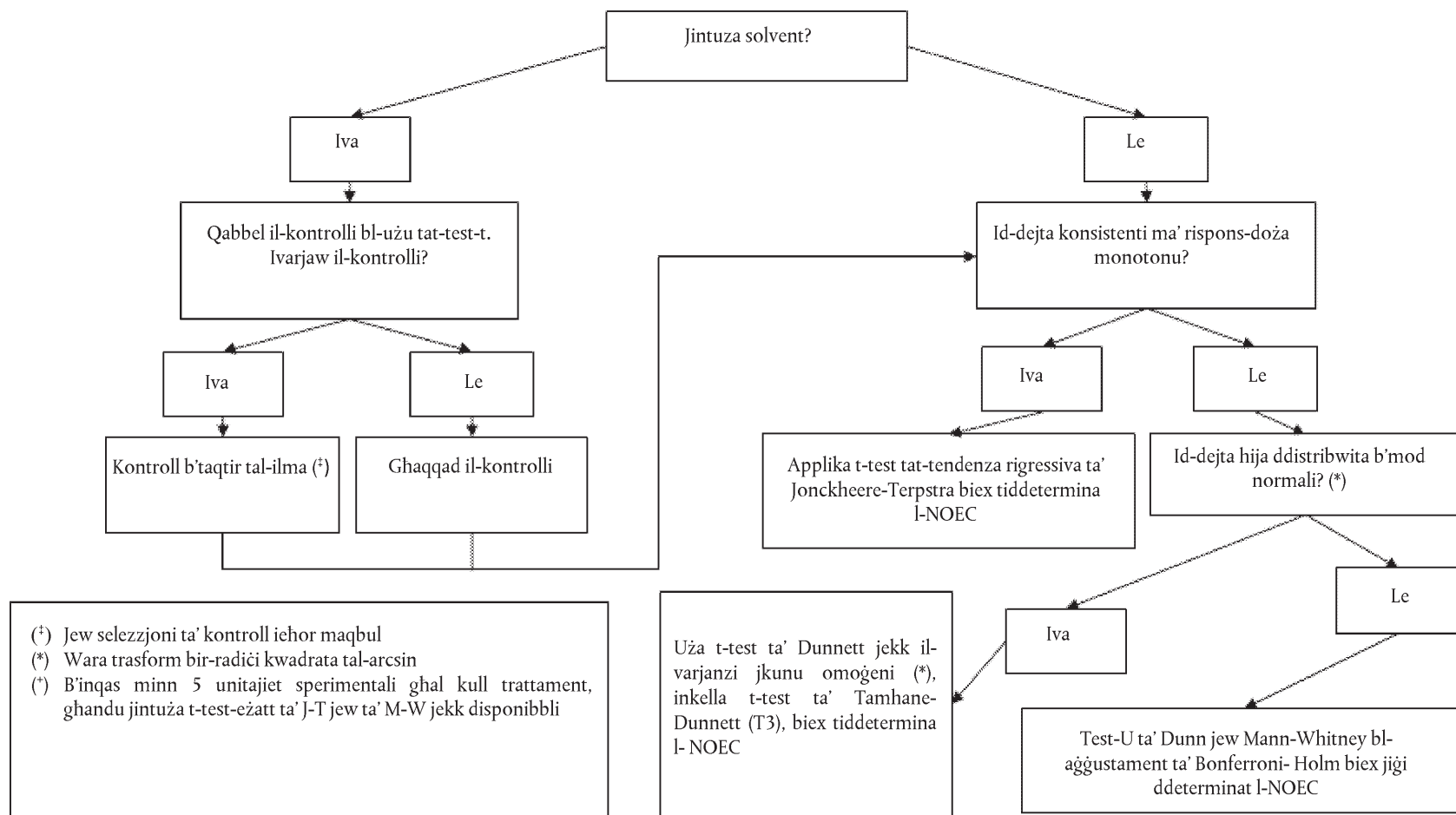
▼M6

- c. Jiġi applikat madwar 0,1 ml tal-midjum tat-tluġh qrib tmiem is-slide faċċata t-tarf finali kiesaħ jew fuq il-vevtrina għatu.
 - d. Il-vevtrina għatu tiddawwar f'angolu baxx u tiġi applikata fuq is-slide.
3. Tikkettar
- e. Kull tikketta tas-slide għandu jkun fiha l-informazzjoni li ġejja.
 - i. Isem il-laboratorju
 - ii. L-ispeċijiet
 - iii. Nru tal-Kampjun / Nru tas-Slide
 - iv. Grupp tat-trattament / Sustanza Kimika
 - v. Data

Flow Chart Statistika ghal analizi tal-vitellogenina



Flow Chart Statistika għal analiżi tal-proporzjon tas-sessi



▼ **M6***Appendiċi 9***Gwida għall-kampjunar tat-tessuti għal determinazzjoni tas-sess ġenetiku u għal-determinazzjoni tas-sess ġenetiku bil-metodu tal-PCR****Il-kampjunar, it-thejjija u l-hżin tat-tessuti qabel ma jiġi stabbilit is-sess ġenetiku bil-metodu PCR fil-medaka (Imhejji mil-Laboratorju għall-Organizmi Akkwatiċi ta' Bayer CropScience AG)**

1. B'imqass jaqta' sew ser tinqata' l-pinna anali jew dorsali f'kull ħuta individwali u titqiegħed f'tubu mimli b'100 µl bafer ta' estrazzjoni 1 (ara iktar 'il quddiem dettalji dwar il-preparazzjoni tal-bafer). L-imqass jitnaddaf wara kull ħuta f'bekk mimli H₂O distillat u mnixxef b'biċċa tal-karti.
2. Imbagħad it-tessuti tal-pinna ser jiġu omogenizzati b'pistil tat-teflon tal-mikro-tubu għal-lizi taċ-ċelloli. Għal kull tubu ser jintuza pistil ġdid biex tiġi evitata kwalunkwe kontaminazzjoni. Il-pistils ser jitqiegħdu f'0,5 M NaOH għal lejl shih, jitlahilhu f'H₂O distillat għal ħames minuti u jinħażnu f'etanol jew jiġu sterilizzati wara l-awtoklava sakemm jintużaw.
3. Huwa possibbli wkoll li t-tessut tal-pinna jinħażen mingħajr ebda bafer ta' estrazzjoni 1 f'silġ xott u mbagħad fi frigġ ta' – 80 °C sabiex tiġi evitata kwalunkwe degradazzjoni tad-DNA. Izda l-estraxxjoni tmur aħjar, jekk testratta d-DNA fl-istess hin (ara iktar 'il fuq dwar it-tqandil; il-kampjuni għandhom jithallew joqogħdu fuq is-silġ wara li jinħażnu f'– 80 °C qabel ma l-bafer jinħażen fit-tubi).
4. Wara l-omogenizzazzjoni, it-tubi kollha jitqiegħdu f'banjumarija u jitgħallew għal 15-il minuta f'100 °C.
5. Imbagħad bil-pipetta ser jiddaħħlu 100 µl bafer ta' estrazzjoni 2 (ara iktar 'il quddiem għal dettalji dwar il-preparazzjoni tal-bafer) f'kull tubu. Il-kampjuni jinħażnu f'temperatura tal-kamra għal 15-il minuta u fl-istess hin kultant ser jitheżżu bl-id sabiex jithalltu bil-galbu.
6. Wara, it-tubi kollha jitqiegħdu fil-banju tal-ilma mill-ġdid u jitgħallew għal 15-il minuta ohra f'100 °C.
7. Sakemm issir analiżi ulterjuri, it-tubi ser jiġu ffrizati f'– 20 °C.

Preparazzjoni tal-bafer

PCR-bafer 1:

500 mg N-Lauroilsarkozina (eż. Merck KGaA, Darmstadt, GE)

2 ml 5M NaCl

ad 100 ml dest. H₂O

→ awtoklava

PCR-bafer 2:

20 g Chelex (eż. Biorad, Munich, GE)

Biex jintefah f'100 ml dest. H₂O

→ awtoklava

Stabbiliment tas-sess ġenetiku (bil-metodu PCR) fil-medaka (Imhejji mil-Laboratorju għall-Organizmi Akkwatiċi ta' Bayer CropScience AG u Universität Würzburg Biozentrum)

It-tubi mhejjin u ffrizati (deskritti fis-sezzjoni ta' hawn fuq) ser jithallew joqogħdu fuq is-silġ. Wara, ser jiġu ċentrifugati bl-użu ta' ċentrifugu Eppendorf (30sek b'velocità massima f'temperatura tal-kamra). Għall-PCR, jintuza s-supernatant ċar isseparat mill-preċipitat. Irid jiġi evitat b'mod assolut milli xi traċċa ta' Chelex (li jinsab fil-preċipitat) tiġi trasferita fir-reazzjoni PCR, għaliex din tinterferixxi mal-attività polimerazi-“Taq”. Is-supernatant ser jintuza direttament jew jista' jinħażen iffrizat (f'– 20 °C) u jerga' jithalla joqogħod f'bosta ċikli mingħajr impatt negattiv fuq id-DNA għal analiżijiet iktar tard.

▼ **M6**1. *Thejjija tat-“Tahlita tar-Reazzjoni” (25 µl għal kull kampjun):*

	Volum	Koncentrazzjoni Finali
DNA Mudell	0,5 µl-2 µl	
10xPCR-bafer b'MgCl ₂	2,5 µl	1x
Nukleotidi (kull wiehed ta' dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Primer 'il Quddiem (10 µM) (ara taht 3-5)	0,5 µl	200 nM
Primer b'Lura (10 µM) (ara taht 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Ilma (grad tal-PCR)	sa 25 µl	
Taq E- Polimerazi	0,3 µl	1,5U
10xPCR-bafer b'MgCl ₂ : 670mM Tris/HCl (pH8,8 at 25°C), 160mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25mM MgCl ₂ , 0,1 %Tween 20		

Għal kull PCR (ara taht 3-5), hemm bżonn tal-primer speċjali bħala tahlita ġdida ta' “Tahlita tar-Reazzjoni” u l-ammont adegwat mehtieg tad-DNA mudell għal kull kampjun (ara iktar 'il fuq). Il-volumi rispettivi jiġu ttrasferiti f'tubi ġodda bl-użu tal-pipetti. Wara jingħalqu t-tubi kollha, jiġihalltu (madwar 0 sek) u jiġu ċċentrifugati (10 sek f'temperatura tal-kamra). Imbagħad ikunu jistgħu jibdwu il-programmi-PCR rispettivi. Barra minn hekk, kontroll pożittiv (kampjun ta' DNA eżemplari b'attività magħrufa u riżultati ċari) u kontroll negattiv (1 µl dest. H₂O) ser jintuża f'kull programm PCR.

2. *Thejjija tal-gel tal-agarozju (1 %) – Meta jkunu qed isiru l-programmi-PCR:*

- Holl 3 g agarozju fi 300 ml × TAE-bafer (1 % gel tal-agarozju)
- Din is-soluzzjoni għandha titghalla b'microwave (madwar 2-3 min)
- Ittrasferixxi s-soluzzjoni taħraq f'kaxxa speċjali għall-funditura, li tkun fuq is-silġ
- Wara madwar 20 min, il-gel tal-agarozju jkun lest sabiex jintuża
- Il-ħzin tal-gel tal-agarozju f'1 × TAE-bafer sa tmiem il-programmi-PCR

3. *Programm-Aċtina-PCR:*

Din ir-reazzjoni tal-PCR għandha l-għan li turi li d-DNA fil-kampjun ma għarrabx hsara.

- Primer speċjali:

“Mact1(superjuri/'il quddiem)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

“Mact2(inferjuri/b'lura)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Programm:

5 min 95 °C

Ċiklu (35 darba):

Denaturazzjoni → 45 sek f'95 °C

Rikottura → 45 sek f'56 °C

Ġebbid → 1 min fi 68 °C

15 min 68 °C

▼ **M6**4. *Programm-PCR tal-Ġeni X u Y:*

Il-kampjuni bid-DNA shiħ jintużaw f'dan il-programm-PCR biex jiġu identifikati l-Ġeni X u Y. Id-DNA tal-irġiel għandu juri faxxa doppja u d-DNA tan-nisa għandu juri faxxa waħda (wara tilwin u elettroforezi bil-ġel). Għal dan il-programm għandu jkun inkluż kontroll pożittiv għall-irġiel (kampjun-XY) u iehor għan-nisa (kampjun-XX).

— Primer speċjali:

“PG 17.5” (superjuri/il quddiem) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC
CCG CTG

“PG 17.6” (inferjuri/b'lura) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG
AGA

— Programm:

5 min 95 °C

Ċiklu (40 darba):

Denaturazzjoni → 45 sek f'95 °C

Rikottura → 45 sek f'55 °C

Ġebbid → 1 min 30 sek f'68 °C
15 min 68 °C

5. *Il-programm-PCR tal-Ġeni Y bħala “kontroll” għall-programm-PCR tal-Ġeni X u Y:*

Dan il-programm-PCR jivverifika r-riżultati tal-“programm-PCR tal-Ġeni X u Y”. Il-“kampjuni tal-irġiel” għandhom juru faxxa waħda u l-“kampjuni tan-nisa” ma għandhom juru ebda faxxa (wara t-tilwin u l-elettroforezi bil-ġel).

— Primer speċjali:

“DMTYa (superjuri/il quddiem)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

“DMTYd (inferjuri/b'lura)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programm

5 min 95 °C

Ċiklu (40 darba):

Denaturazzjoni → 45 sek f'95 °C

Rikottura → 45 sek f'56 °C

Ġebbid → 1 min f'68 °C
15 min 68 °C

6. *Tilwin tal-kampjuni tal-PCR:*

Soluzzjoni tat-tilwin:

50 % Glicerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % Bromfenolblu

0,25 % Ksilensianol

Bil-pipetta dahħal 1 µl soluzzjoni tat-tilwin f'kull tubu

7. *Bidu tal-Elettroforezi bil-Ġel:*

— Il-ġel tal-agarozju ta' 1 % jiġi ttrasferit f'kompartiment ta' elettroforezi bil-ġel mimli b'1 × TAE-Bafer

— 10 — 15 µl minn kull kampjun tal-PCR imlewwen ser jiddaħhlu f'taqsim tal-ġel tal-agarozju

— Anki 5 — 15 µl tal-1kb-“Ladder” (Invitrogen) ser jiddaħhlu bil-pipetta f'taqsim separata

— Ibda l-elettroforezi b'200 V

— Waqqafha wara 30-45 min

▼ **M6**

8. *Stabbiliment tal-faxex:*

- Naddaf il-ġel tal-agarożju f'H₂O distillat
- Imbagħad ittrasferixxi l-ġel tal-agarożju fi bromid tal-Etidju għal 15 — 30 min
- Wara għandu jittiehed ritratt tal-ġel tal-agrożju f'kaxxa tad-dawl UV.
- Fl-aħħar, il-kampjuni jiġu analizzati f'paragun mal-faxxa (jew faxex) ta' kontroll pożittiv u l-ladder.

▼ **M6***Appendiċi 10***Gwida dwar il-kampjunar tat-tessuti sabiex jiġi stabbilit is-sess ġenetiku bil-metodu tal-PCR fl-ispinarell****Kampjunar tat-tessut u estrazzjoni tad-DNA**

Id-DNA jista' jiġi estratt bl-użu ta' firxa ta' reagenti kummerċjalment disponibbli u sistemi ta' estrazzjoni manwali kif ukoll awtomatizzati. Il-protokoll użat fil-laboratorju Cefas f'Weymouth huwa spjegat hawn taht, u żdiedu l-approċċi alternattivi fejn kienu xierqa.

1. B'imqass li jaqta' sew, titnehha biċċa tessut żgħira (10-20 mg) miż-zona dorsolaterali (wara t-tnehhija tar-ras u d-denb għal analiżi tal-VTG) minn kull huta individwali. It-tessut jiddaħħal f'tubu u jew jitqiegħed direttament f'nitroġenu likwidu (għall-ħżin fi – 80 °C) jew inkella jimtela b'70 % etanol (għat-trasport u l-ħżin sussegwenti f'4 °C). L-imqass jitnaddaf wara kull huta f'70 % etanol u mbagħad f'ilma ddistillat u jitnixxef b'biċċa tal-karti.
2. L-etanol (jekk preżenti) jitnehha b'aspirazzjoni u t-tessut jiġi diġestit tul il-lejl bi proteinazi K f'400 µl bafer ATL (Qiagen). Alikwota (200 µl) tad-diġest tiġi ttrasferita fi blokka-S b'96 toqba (Qiagen) u d-DNA jiġi estratt f'format ta' 96 toqba bl-żu tal-Qiagen Universal BioRobot u l-Qiamp Investigator BioRobot kit. Id-DNA jiġi elwit f'50 µl ilma hieles DNase u RNase. Jekk jintużaw tessuti ibsin biex jiġi estratt id-DNA (bħal spina jew pinna pettorali) jaf ikun hemm bżonn li l-kampjun jiġi omogenizzat fil-bafer tal-lizi bl-użu ta' FastPrep® tissue lyser jew sistema ekwivalenti ta' interferent tat-tessuti.

Inkella,

- (a) it-tessut jiġi diġestit tul il-lejl bil-proteinazi K f'400 µl G2 bafer tal-lizi (Qiagen) u d-DNA jiġi estratt minn 200 µl tad-diġest bl-użu tal-EZ-1 DNA easy tissue mini kit u l-EZ-1 biorobot jew inkella bid-DNA easy mini tissue kit. Id-DNA jiġi elwit f'volum ta' 50 µl.
- (b) It-tessuti jiġu pproċessati bl-użu tar-reagent DNAzol. Għal ftit żmien, il-kampjuni tat-tessut jiġu lizati f'1ml DNAzol għal 10 minuti f'mikrotubu ċentrifugu ta' 1,5 ml u mbagħad jiġu ċentrifugati fi 13 000 rpm għal 5 minuti biex titnehha kwalunkwe materja partikolata. Imbagħad, il-kampjun lizat jiġi ttrasferit f'mikrotubu ċentrifugu ġdid ta' 1,5 ml li fih 500 µl 100 % etanol ta' grad molekulari u mbagħad jiġi ċentrifugat fi 13 000 rpm għal 10 minuti sabiex jiġi ppreċipitat id-DNA. L-etanol jitnehha u jiġi sostitwit ma' 400 µl 70 % etanol ta' grad molekulari, iċċentrifugat fi 13 000 rpm għal 5 minuti u l-gerbuba tad-DNA tiġi dissolta f'50 µl ilma hieles DNase u RNase molekulari. Mill-ġdid, meta jintużaw tessuti ibsin (pinna pettorali), jaf ikun hemm bżonn li l-kampjun jiġi omogenizzat fil-bafer tal-lizi bl-użu ta' lizatur tat-tessut FastPrep® jew sistema ta' interferent tat-tessut ekwivalenti qabel ma jiġi estratt id-DNA.

3. Id-DNA jinħażen f'– 20 °C sa kemm hemm bżonn.

Nota importanti: iridu jintlibsu l-ingwanti matul il-proċeduri.

Analiżi tar-reazzjoni katina tal-polimerazi (PCR)

Saru amplifikazzjonijiet bl-użu ta' 2,5 µl mill-estratt tad-DNA f' volum ta' reazzjoni ta' 50 µl bl-użu tal-Idh locus primers (kif deskritt minn Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

Primer 'il quddiem	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Primer b'lura	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼ **M6**

Hemm bosta fornituri ta' reagenti xierqa tal-PCR. Il-metodu spjegat hawn taht huwa dak li bhalissa jintuza fil-laboratorju Cefas f'Weymouth.

1. *Thejjiya tat-“Tahlita ta' Reazzjoni” (50 µl għal kull kampjun):*

Tithejja supertahlita kif ġej. Din tista' tithejja minn qabel u tinħażen iffrizata f' -20 °C sakemm hemm bżonn. Aghmel supertahlita suffiċjenti għal kontroll negattiv (ilma ta' grad tal-bijologija molekolari biss).

	Volum (konc. tal-istokk)/ kampjun	Koncentrazzjoni Finali
5xGoTaq® Bafer ta' Reazzjoni	10 µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM kull wieħed)	250 µM kull wieħed
Primer 'il Quddiem	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Primer b'Lura	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Ilma ta' grad tal-bijologija molekolari	30,75 µl	
GoTaq polimerazi	0,25 µl	1,25 U

— Iddistribwixxi 47,5 µl ftubu tal-PCR ittikkettat b'hajt irqiq ta' 0,5 ml.

— Żid 2,5 µl tad-DNA ippurifikat fit-tubu ttikkettat kif xieraq. Irrepeti għall-kampjuni kollha u l-kontroll negattiv.

— Fuqhom itfa' 2 taqtiriet żejt minerali. Inkella, uza ċiklatur termali b'ghatu msahhan.

— Aghlaq l-għotjien.

— Il-kampjuni ġew denaturati f'ċiklatur termali Peltier PTC-225 f'94 ± 2 °C għal 5 minuti segwiti minn 39 ċiklu ta' 94 ± 2 °C għal minuta, 55 ± 2 °C għal minuta, 72 ± 2 °C għal minuta, u estensjoni finali ta' 72 ± 2 °C għal 10 minuti.

2. *Thejjiya tal-ġel tal-agarozju (2 %):*

Tradizzjonalment, il-prodotti tal-PCR jiġu riżolti fuq 20 % ġel tal-agarozju li fih etidju tal-bromur.

Jistgħu jintużaw ukoll sistemi ta' elettroforezi bbażati fuq il-kapillari.

— Iżen 2 g agarozju f'100 ml 1 × TAE-bafer

— Sahhan f'microwave (madwar 2-3 min) biex tholl l-agarozju.

— Żid 2 taqtiriet tal-koncentrazzjoni finali tal-bromur tal-etidju 0,5 µg/ml

— Ittrasferixxi s-soluzzjoni taħraq fit-tagħmir ta' funditura tal-ġel.

— Halli l-ġel jibbies

3. *Elettroforezi bil-ġel:*

— Ittrasferixxi l-ġel tal-agarozju fit-tagħmir tal-elettroforezi u għaddsu f'1 × TAE-bafer

— Tella' 20 µl minn kull kampjun f'toqba separata, billi żżid markatur tal-piż molekolari (100 bp DNA ladder, Promega) f'toqba vojta.

— L-elettroforezi ssir f'120 V għal 30-45 minuta.

▼ M6**4. *Viżwalizzazzjoni tal-prodotti ta' amplifikazzjoni***

Jekk il-bromur tal-etidju għe inkorporat fil-ġel tal-agarożju kif spjegat iktar 'il fuq, il-prodotti tad-DNA jiġu vviżwalizzati taht sors tal-UV. Inkella, il-ġel tal-agarożju jinghata lewn billi l-ġel jinkesa b' soluzzjoni dilwita ta' bromur tal-etidju (0,5 µg/ml fl-ilma) għal 30 minuta qabel il-viżwalizzazzjoni.

▼ **M6***Appendiċi 11***Gwida għall-proċedura ta' fertilizzazzjoni artifiċjali għall-ispinarell**

L-iskop ta' din is-sezzjoni huwa li tiddeskrivi l-proċeduri sabiex jinkiseb bajd iffertilizzat mill-ispinarell sabiex jintuża fl-FSDT.

Proċeduri

Kisba ta' sperma mill-irġiel

1. Jiġi ewtanizzat raġel b'kulur xieraq mill-popolazzjoni mixtieqa.
2. It-testikoli jiġu dissezzjonati minn kull naħa tal-ħuta. *It-testikoli ġeneralment ikunu strutturi b'pigmentazzjoni skura u f'forma ta' lasta li mill-ewwel jidhru fil-linja tan-nofs laterali tal-ġisem.* Uża wieħed mill-metodi li ġejjin:
3. Billi tuża par imqass jaqta' sew, ibda fil-kloaka u aġmel inċiżjoni ta' 1,5 cm b'qatgħa waħda f'angolu ta' madwar 45 grad.
4. Uża sikkina kirurġika biex tagħmel inċiżjoni żgħira fil-ġenb tal-ħuta flit wara l-pelvi u ventrali mis-saffi laterali.
5. It-testikoli jitnehhew bl-użu ta' forċipi tajbin u jitqiegħdu f'dixx petri.
6. Kull testikola tinksa b'100 µl **soluzzjoni finali ta' Hank (*)** magħmula friska.
7. It-testikoli jinqasmu bir-reqqa bl-użu ta' xafra jew sikkina kirurġika. Dan ser jehles l-isperma u jaġhti dehra m'ajpra lis-soluzzjoni ta' Hank.
8. Il-fluwidu li fih l-isperma tiddaħhal f'tubu, filwaqt li jiġi evitat milli tiddaħhal xi biċċa mit-testikoli meta tintuża l-pipetta.
9. 800 µl mis-soluzzjoni finali ta' Hank jiddaħhlu fit-tubu u jithawdu sew.
10. Jekk ikun hemm bżonn, ir-raġel jista' jiġi ppreservat billi jiġi ffissat f'100 % etanol jew fissattiv mixtieq ieħor. Dan huwa ta' importanza partikolari jekk l-istudju jkun qiegħed jassenja l-orġini mill-ġenituri tal-ħut żgħir.

Nota importanti: *Għad li hafna mis-soluzzjonijiet ewlenin meħtieġa jistgħu jsiru minn qabel, l-istokk 5 u mbagħad is-soluzzjoni finali għandhom isiru friski dakinhar tal-użu.*

Stokk 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Ilma distillat (DW)	100 ml

Stokk 2

Na ₂ HPO ₄ (anidruż)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
DW	100 ml

Stokk 3

CaCl ₂	0,72 g
DW	50 ml

(*) Is-Soluzzjoni Mmellha Bbaferjata ta' Hank (HBSS):

L-HBSS hija meħtieġa sabiex tiġi ppreservata l-isperma filwaqt li tithejja l-fertilizzazzjoni.

▼ M6**Stokk 4**

MgSO ₄ 7H ₂ O	1,23 g
DW	50 ml

Stokk 5 (ippreparat frisk)

NaHCO ₃	0,35 g
DW	10 ml

Nota: Jekk diġà għandek uhud mill-melbiet ta' hawn fuq iżda b'kontenut ta' ilma differenti (jiġifieri 2H₂O minflok anidru) xorta tista' tużahom iżda l-ewwel trid taġġusta l-piż fuq il-bażi tal-piż molekolari).

Għas-soluzzjoni finali ta' Hank, għaqqad fl-ordni li ġejja:

stokk 1	1,0 ml
stokk 2	0,1 ml
stokk 3	0,1 ml
DW	8,6 ml
stokk 4	0,1 ml
stokk 5	0,1 ml

Hawdu sew qabel l-użu.

Fertilizzazzjoni

1. Mill-popolazzjoni mixtieqa jiġu identifikati n-nisa kbar u tqal; in-nisa jkun l-estri tagħhom biss meta tkun tisa' tara l-bajd hiereġ mill-kloaka. In-nisa l-estri għandhom il-karatteristika tal-qagħda "b'rashom mghollija".
2. Mexxi sebghek jew sebghek il-kbir bil-mod fuq il-ġenb tal-huta lejn denbha biex thegġeg il-hrug ta' borża tal-bajd f'dixx petri għdid. Irrepeti fuq in-naha l-oħra u qiegħed il-huta lura fit-tank tagħha.
3. Il-bajd jista' jittferrex (biex jifforma monosaff) bl-użu ta' pinzell fin. Importanti li ttipprova tesponi kemm-il bajda possibbli għall-isperma u b'hekk jghin li tiġi massimizzata ż-żona tal-wiċċ tal-uċuħ. Nota importanti: Żomm il-bajd umdu billi tqiegħed biċċa karta niedja madwarhom (importanti li l-bajd ma jmissx mal-ilma direttament peress li dan jista' jwebbes il-korjon b'mod prematur u jipprevjeni l-fertilizzazzjoni). Hemm varjazzjoni kbira fin-numru ta' bajd li kull mara tista' tipproduċi iżda, bħala medja, faċilment għandhom jinkisbu madwar 150 bajda minn mara tqila.
4. 25µl sperma fit-tahlita ta' Hank titferrex b'mod indaq fuq il-wiċċ shih tal-bajd bl-użu tal-pinzell. Il-bajd malajr jibbies u jibdel il-kulur (fi żmien minuta) ladarba tibda l-fertilizzazzjoni. Jekk in-numru stmat ta' bajd ikun ta' iktar minn 150, irrepeti l-proċedura. B'mod simili, jekk il-bajd ma jibbiesx fi żmien minuta, žid ftit iktar sperma. Nota importanti: Iz-żieda ta' iktar sperma mhux bilfors itejjeb ir-rata ta' fertilizzazzjoni.
5. Il-bajd u s-soluzzjoni tal-isperma għandhom jithallew "jinteragixxu" għal tal-inqas 15-il minuta u l-bajd iffertilizzat għandu jitqiegħed fl-akkwarji ta' espożizzjoni fi żmien siegħa u nofs wara l-fertilizzazzjoni.
6. Il-proċedura tiġi ripetuta bl-użu ta' mara oħra sakemm jingabar in-numru mixtieq ta' bajd.
7. Halli ftit bajd mill-aħhar lott u ffissahom f'10 % acidu acetiku.

▼ M6**L-ghadd u d-distribuzzjoni tal-bajd fl-akkwarji tat-test**

1. Il-bajd għandu jitqassam b'mod indaqs bejn kull livell tat-trattament sabiex jiġi evitat preġudizzju ġenetiku. Kull lott ta' bajd iffertilizzat għandu jiġi sseparat fi gruppi ndaqs (daqs il-livelli tat-trattament) bl-użu ta' strument bil-ponta (jiġifieri forċipi tal-entomologija b'xafra wiesgħa jew l-użu ta' loop ta' inokulazzjoni). Jekk għandek mira ta' 4 irreplikati għal kull trattament, b'20 bajda kull wiehed, f'dak il-każ trid tiddistribwixxi 80 bajda għal kull akkwarju ta' espożizzjoni. Nota importanti: Huwa rakkomandat li jiżdiedu 20 % oħra (jiġifieri 96 bajda għal kull livell tat-trattament) sakemm ma tkunx żgur li ser tikseb rati ta' fertilizzazzjoni ta' 100 %.
2. Il-bajd tal-ispinarell malajr jista' jiehu infezzjoni fungali barra l-bejta mharsa mill-missier. F'dan ir-rigward, it-trattament tal-bajd kollu bil-metilen blu matul l-ewwel hamest ijiem tat-test huwa ta' importanza assoluta. Soluzzjoni ewlenija tal-metilen blu tithejja f'1 mg/ml u tiddaħhal fl-akkwarji ta' espożizzjoni sabiex tinghata konċentrazzjoni finali massima ta' 2,125 mg/l. Nota importanti: L-ispinarelli ma għandhomx ikunu esposti għal metilen blu ladarba jfaqqsu u b'hekk is-sistema għandha tkun hielsa minn metilen blu sal-jum 6.
3. Il-bajd jiġi spezzjonat kuljum u kwalunkwe bajd mejjet jew mhux iffertilizzat irid jiġi rreġistrat bħalatali. Nota importanti: Il-bajd qatt ma għandu jkun barra l-ilma sakemm ifaqqas, lanqas għal perjodi qosra hafna.

▼ M6

C.42. BIJODEGRADABILITÀ FL-ILMA BAHAR

INTRODUZZJONI ĠENERALI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 306 tal-OECD (1992). Meta ġew żviluppati l-metodi ta' ttestjar oriġinali, ma kienx magħruf kemm ir-riżultati mit-testijiet ta' tgharbil għal bijodegradabilità lesta bl-użu ta' ilma helu, u effluwent tad-drenaġġ jew hama attivat bħala inokulu, jistgħu jiġu applikati għall-ambjent marittimu. Fuq dan il-punt ġew irrapportati riżultati li jvarjaw (eż. (1)).
2. Hafna ilmiġiet industrijali mormijin, li fihom firxa ta' sustanzi kimiċi, jilhq u l-baħar jew permezz ta' skariku dirett jew permezz ta' estwarji u xmajjar li fihom iż-żminijiet ta' residenza huma baxxi meta mqabblin mal-perjodu mehtieg għal bijodegradazzjoni shiha ta' hafna mis-sustanzi kimiċi preżenti. Minhabba l-għarfien dejjem ikbar tal-bżonn li jiġi protett l-ambjent marittimu kontra volumi dejjem ikbar ta' sustanzi kimiċi u l-htieġa li tiġi smata l-konċentrazzjoni probabbli tas-sustanzi kimiċi fil-baħar, ġew żviluppati metodi ta' ttestjar għall-bijodegradabilità fl-ilma baħar.
3. Il-metodi deskritti hawnhekk jużaw ilma bħala naturali kemm bħala l-faġi milwiema kif ukoll bħala s-sors tal-mikroorganizmi. Sabiex tinzamm konformità mal-metodi għal bijodegradabilità lesta fl-ilma helu, ġie investigat l-użu ta' ilma baħar ultrafiltrat u ċcentrifugat, u hekk ukoll ġie investigat l-użu ta' naqal marittimu bħala inokulu. Dawn l-investigazzjonijiet ma rnexxewx. Għaldaqstant, il-midjum tat-test huwa ilma baħar naturali ttrattat minn qabel sabiex jitnehhew partikoli mhux maħdumin.
4. Sabiex tiġi vvalutata l-bijodegradabilità finali bil-Metodu Flask Mheżżeż, iridu jintużaw konċentrazzjonijiet relattivament għoljin tas-sustanza tat-test minhabba s-sensittività baxxa tal-metodu analitiku tal-karbonju organiku dissolt (DOC). Min-naha tiegħu, dan jehtieg li mal-ilma baħar jiżdiedu nutrijenti minerali (N u P), li l-konċentrazzjonijiet baxxi tagħhom ikunu qed jillimitaw it-tnehhija tad-DOC. Jista' jkun hemm bżonn li jiżdiedu wkoll in-nutrijenti fil-Metodu Flixkun Magħluq minhabba l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test miżjuda.
5. B'hekk, il-metodi mhumix ittestjati għal bijodegradabilità lesta peress li ma jiżdied ebda inokulu mal-mikroorganizmi diġà preżenti fl-ilma baħar. It-testijiet lanqas ma jissimulaw l-ambjent marittimu peress li jiżdiedu n-nutrijenti u l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test hija ferm oghla minn dik li tkun preżenti fil-baħar. Għal dawn ir-raġunijiet, il-metodi huma proposti taħt subsezzjoni ġdida "Bijodegradabilità fl-Ilma Baħar".

APPLIKAZZJONI

6. Ir-riżultati tat-testijiet, li jiġu applikati għaliex il-mudell ta' użu u rimi tas-sustanza inkwistjoni indika rotta lejn il-baħar, taw l-ewwel impressjoni ta' bijodegradabilità fl-ilma baħar. Jekk ir-riżultat ikun pożittiv (tnehhija ta' > 70 % DOC; > 60 % ThOD — domanda teorika ta' ossiġenu), jista' jiġi konkluż li hemm potenzjal għal bijodegradazzjoni fl-ambjent marittimu. Madankollu, riżultat negattiv ma jipprekcludix potenzjal bħal dan iżda jindika li hemm bżonn isiru iktar studji, pereżempju, bl-użu tal-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test possibbli.

▼ M6

7. Fi kwalunkwe każ, jekk hemm bżonn ta' valur iktar definittiv għar-rata jew il-grad ta' bijodegradazzjoni fl-ilma baħar f'sit partikolari, ikollhom jiġu applikati metodi oħrajn li huma iktar kumplessi u sofistikati, u b'hekk li jiswew iktar flus. Pereżempju, test ta' simulazzjoni jista' jiġi applikat bl-użu ta' konċentrazzjoni ta' sustanza tat-test li tkun eqreb il-konċentrazzjoni ambjentali probabbli. Barra minn hekk, jista' jintuża ilma baħar mhux iffortifikat u mhux ittrattat minn qabel meħud mill-post ta' interess u l-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi segwita b'analizi kimika speċifika. Għall-bijodegradabilità finali, ikunu meħtieġa sustanzi ttikkettati-¹⁴C sabiex ikunu jistgħu jitkejlu r-rati tal-għibien tal-¹⁴C organiċi solubbli u l-produttjoni tal-¹⁴CO₂ f'konċentrazzjonijiet ambjentalment realistiki.

GHAŻLA TAL-METODI

8. L-għażla ta' liema metodu għandu jintuża tiddependi minn għadd ta' fatturi; tinghata t-Tabella li ġejja biex tgħin fl-għażla. Filwaqt li s-sustanzi tas-solubilità tal-ilma inqas mill-ekwivalenti ta' madwar 5 mg C/l ma jistgħux jiġu ttestjati fil-Metodu tal-Flask Mheżżeż, tal-inqas, fil-prinċipju, sustanzi ftit li xejn solubbli jistgħu jiġu ttestjati fil-Metodu tal-Flixxun Magħluq.

Tabella

Vantaġġi u żvantaġġi tat-test tal-flask mheżżeż u l-flixxun magħluq

METODU	VANTAĠĠI	ZVANTAĠĠI
FLASK MHEŻŻEŻ	— apparat sempliċi hlief analizzatur tal-K — durata ta' 60 jum mhix problema — ebda xkiel min-nitrifikazzjoni — jista' jiġi adattat għal sustanzi volatili	— jehtieg analizzatur tal-K — juża 5-40 mg DOC/l, jista' jkun ta' xkiel — stabbiliment tad-DOC diffiċli f'konċentrazzjonijiet baxxi f'ilma baħar (effett tal-klorur) — kultant DOC għoli f'ilma baħar
FLIXKUN MAGHLUQ	— apparat sempliċi — stabbiliment bi tmiem sempliċi — juża konċentrazzjoni baxxa tas-sustanza tat-test (2 mg/l) u b'hekk hemm inqas possibbiltà ta' varjazzjoni — faċilment adattat għal sustanzi volatili	— jaf ikun diffiċli biex tinzamm l-għeluq tal-arja tal-fliexken — it-tkabbir mal-hitan ta' batterji jista' jwassal għal valuri foloz — il-valuri inbjank ta' teħid tal-O₂ jistgħu jkunu għoljin speċjalment wara 28 jum; jista' jiġi evitat aktar ma jiqdiem l-ilma baħar — xkiel possibbli mit-teħid ta' O₂ bin-nitrifikazzjoni

METODU TAL-FLASK MHEŻŻEŻ

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu huwa varjant tal-ilma baħar tat-Test ta' Tgharbil Immodifikat tal-OECD deskritt fil-Kapitolu C.4B ta' dan l-Anness (2). Ġie ffinalizzat wara ringtest organizzat għall-Kummissjoni Ewropea (KE) mill-Istitut tad-Danimarka għall-Kwalità tal-Ilma (3).
2. Bl-istess mod bħall-Metodu marittimu tal-Flixxun Magħluq li jakkumpanjah, ir-riżultati minn dan it-test ma għandhomx jittiehdu bħala indikaturi ta' bijodegradabilità lesta, iżda jridu jintużaw b'mod speċifiku sabiex tinkiseb informazzjoni dwar il-bijodegradabilità tas-sustanzi f'ambjenti marittimi.

▼ M6

PRINĊIPJU TAL-METODU

3. Ammont prestabbilit tas-sustanza tat-test huwa dissolt fil-midjum tat-test biex tinhareġ konċentrazzjoni ta' 5-40 mg karbonju organiku dissolt (DOC)/l. Jekk il-limiti tas-sensittività tal-analizijiet tal-karbonju organiku jitjiebu, l-użu ta' konċentrazzjonijiet inqas tas-sustanza tat-test jista' jkun ta' vantaġġ, b'mod partikolari għal sustanzi inibitorji. Is-soluzzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tat-test tigi inkubata waqt thawwid fid-dlam jew f'dawl bati f'kundizzjonijiet aerobiċi b'temperatura fissa (ikkontrollata għal $\pm 2^{\circ}\text{C}$) li normalment tkun fi hdan il-medda ta' 15-20°C. F'kazijiet li fihom l-oġettiv tal-istudju jkun li jiġu ssimulati sitwazzjonijiet ambjentali, jistgħu jsiru testijiet lil hinn minn din il-medda normali tat-temperatura. Id-durata massima rrakkomandata hija ta' madwar 60 jum. Id-degradazzjoni hija segwita minn kejliet tad-DOC (degradazzjoni finali) u, f'xi kazijiet, minn analiżi speċifika (degradazzjoni primarja).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

4. Sabiex isir magħruf jekk it-test jistax jiġi applikat għal sustanza partikolari, iridu jkunu magħrufin uħud mill-karatteristiċi tiegħu. Il-kontenut ta' karbonju organiku tas-sustanza jrid jiġi stabbilit, il-volatilità tagħha trid tkun tali li ma jseħhx telf sinifikanti matul it-test u s-solubilità tagħha fl-ilma trid tkun ikbar mill-ekwivalenti ta' 25-40 mg C/l. Barra minn hekk, il-materjal tat-test ma għandux jaqbad b'mod sinifikanti ma' uċuħ tal-ħġieġ. Hemm bżonn ta' informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet rilevanti ta' komponenti kbar tal-materjal tat-test sabiex ikunu jistgħu jiġu interpretati r-rizultati, speċjalment meta r-rizultat ikun qrib il-livell ta' "suċċess".
5. Informazzjoni dwar it-tossicità tas-sustanza tat-test għall-batterji, pereżempju kif imkejla fit-testijiet tar-rata ta' respirazzjoni fuq terminu qasir (4), tista' tkun siewja meta jingħazlu l-konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista' tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri ta' bijodegradazzjoni baxxi. Madankollu, it-tali informazzjoni mhux dejjem tkun bizzejjed sabiex jiġu interpretati rizultati miksubin fit-test ta' bijodegradazzjoni u l-proċedura deskritta fil-paragrafu 18 hija iktar adattata.

SUSTANZI TA' REFERENZA

6. Iridu jintużaw sustanzi xierqa ta' referenza sabiex tiġi kkontrollata l-attività mikrobjali tal-kampjun ta' ilma baħar. Benzoat tas-sodju, aċetat tas-sodju u anilina huma eżempji ta' sustanzi li jistgħu jintużaw għal dan il-ghan. Is-sustanzi ta' referenza jridu jiġu degradati fi hdan perjodu ta' żmien raġonevolment qasir, inkella huwa rrakkomandat li t-test jiġi ripetut bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar.
7. Fir-ringtest tal-KE li fih ittiehdu kampjuni ta' ilma baħar f'postijiet differenti u fi żminijiet differenti tas-sena (3), il-faži ta' dewmien (t_L) u ż-żmien sakemm tinkiseb degradazzjoni ta' 50 fil-mija (t_{50}), hlief il-faži ta' dewmien, kienu ta' bejn jum u 4 ijiem u bejn jum u 7 rispettivament għall-benzoat tas-sodju. Għal anilina, t_L varjat bejn 0 sa 10 ijiem, filwaqt li t_{50} varjat bejn jum u 10.

RIPRODUCIBILITÀ U SENSITTIVITÀ TAL-METODU

8. Ir-riproduċibilità tal-metodu giet stabbilita fir-ringtest (3). L-inqas konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test, li għaliha dan il-metodu jista' jintuża b'analizi tad-DOC, hija fil-parti l-kbira ddeterminata mil-limitu ta' identifikazzjoni tal-analiżi tal-karbonju organiku (madwar 0,5 mg C/l bħalissa) u l-konċentrazzjoni tal-karbonju organiku dissolt fl-ilma baħar użat (normalment fl-ordni ta' 3-5 mg/l għal ilma mill-baħar internazzjonali). Il-konċentrazzjoni ta' sfond tad-DOC ma għandhiex taqbeż madwar 20 % tal-konċentrazzjoni

▼ **M6**

totali tad-DOC wara li tiddaħħal is-sustanza tat-test. Jekk dan ma jkunx fattibbli, il-konċentrazzjoni ta' sfond tad-DOC kultant tkun tista' titnaqqas iktar ma jiqdiem l-ilma baħar qabel l-ittestjar. Jekk il-metodu jintuza b'analizi kimika speċifika biss (li biha titkejjel id-degradazzjoni primarja), l-investigatur irid jiddokumenta, billi jforni informazzjoni addizzjonali, jekk tistax tkun mistennija degradabilità finali. Din l-informazzjoni addizzjonali tista' tikkonsisti fir-riżultati minn testijiet oħrajn għal bijodegradabilità lesta jew inerenti.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Apparat**

9. Apparat normali tal-laboratorju u
 - a. Magna xejker li tiflah flasks Erlenmeyer ta' 0,5-2 litri, jew b'kontroll awtomatiku tat-temperatura jew użata f'kambra b'temperatura kostanti ta' 15-20 °C ikkontrollata għal ± 2 °C;
 - b. Flasks Erlenmeyer ta' 0,5-2 litri b'għonq irqiq
 - c. Apparat għall-filtrazzjoni tal-membrana, jew ċentrifugu;
 - d. Filtri tal-membrana, 0,2-0,45µm;
 - e. Analizzatur tal-karbonju;
 - f. Tagħmir għal analizi speċifika (mhux obbligatorju).

Ilma baħar

10. Hu kampjun ta' ilma baħar f'kontenitur imnaddaf sew u huđu fil-laboratorju, idealment fi żmien jum jew jumejn mit-tehid. Matul it-trasport, thallix it-temperatura tal-kampjun taqbeż wisq it-temperatura li għandha tintuża fit-test. Identifika l-post tal-kampjunar bi preċiżjoni u ddeskrivih f'termini tal-istatus ta' tniġġis u n-nutrijenti tiegħu. B'mod partikolari għal ilmijiet tal-kosta, f'din il-karatterizzazzjoni għandek tinkludi l-ghadd tal-kolonja mikrobjali eterotrofika u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet ta' nitrat, ammonijaka u fosfat dissolti.
11. Ipprovi l-informazzjoni li ġejja għall-kampjun ta' ilma baħar stess:
 - id-data tat-tehid;
 - il-fond tat-tehid;
 - id-dehra tal-kampjun — imċajpar, eċċ.;
 - it-temperatura f'hin it-tehid;
 - is-salinità;
 - id-DOC;
 - id-dewmien bejn it-tehid u l-użu fit-test.
12. Jekk il-kontenut tad-DOC tal-kampjun ta' ilma baħar jinstab li huwa għoli (paragrafu 8), huwa rrakkomandat li l-ilma baħar jithalla jiqdiem b'gimgha qabel jintuza. Hallih jiqdiem billi taħżnu f'kundizzjonijiet aerobiċi fit-temperaturi tat-test u fid-dlam jew f'dawl bati. Jekk hemm bżonn, zomm il-kundizzjonijiet aerobiċi permezz ta' għoti tal-arja hafifa. Meta jkun qed jiqdiem,

▼M6

jonqos il-kontenut tal-materjal organiku faċilment degradabbli. Fir-ringtest (3), ma nstabebda differenza bejn il-potenzjal ta' degradazzjoni tal-kampjuni ta' ilma baħar li qdiemu u daww miġburin friski. Qabel jintuża, ittratta l-ilma baħar minn qabel biex tneħħi partikoli mhux maħdumin, eż. b'filtrazzjoni permezz ta' filtru tan-najlon jew karta filtru harxa (mhux membrana jew filtri GF-C), jew b'sedimentazzjoni u dikantar. Trid tiġi rrapportata l-proċedura użata. Il-pretrattament aghmlu wara li jiqdiem, jekk jintuża.

Soluzzjonijiet ewlenin għal nutrijenti minerali

13. Hejji s-soluzzjonijiet ewlenin li ġejjin, billi tuża reagenti ta' grad analitiku:

(a) Potassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4 8,50 g

Dipotassju idroġenu ortofosfat, K_2HPO_4 21,75 g

Disodju idroġenu ortofosfat diidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33,30 g

Klorid tal-ammonium, NH_4Cl 0,50 g

Holl u tella' sa litru b'ilma distillat.

(b) Klorur tal-kalċju, CaCl_2 27,50 g

Holl u tella' sa litru b'ilma distillat.

(c) Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g

Holl u tella' sa litru b'ilma distillat.

(d) Hadid (III) eksaidrat tal-klorid, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g

Holl u tella' sa litru b'ilma distillat.

Preċipitazzjoni fis-soluzzjoni (d) tista' tiġi evitata billi tiżdied qatra ta' HCl ikkonċentrat jew 0,4 g etilenedjamine-tetra-aċidu aċetiku (EDTA, melh disodju) għal kull litru. Jekk jifforma preċipitat f'soluzzjoni ewlenija, ibdilha ma' soluzzjoni magħmula ġdida.

Preparazzjoni tal-midjum tat-test

14. Żid 1 ml ta' kull waħda mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' hawn fuq għal kull litru ilma baħar pretrattat.

Inokulu

15. Izzidx inokulu speċifiku minbarra l-mikroorganizmi diġà preżenti fl-ilma baħar. Sib (mhux bilfors) in-numru ta' eterotrofi li jiffurmaw kolonji fil-midjum tat-test tal-ilma baħar (u idealment anki fil-kampjuni originali tal-ilma baħar) eż. bl-ghadd tal-platti, bl-użu ta' agar marittimu. Dan ikun partikolarment utli għal kampjuni minn siti kostali jew imniġġsin. Ivverifika l-attività mikrobjali eterotrofika fl-ilma baħar billi tagħmel test b'sustanza ta' referenza.

▼ **M6****Preparazzjoni tal-flasks**

16. Ara li l-oġġetti kollha tal-ħġieġ huma nodfa tazza, mhux bilfors sterelizzati, (eż. bl-użu ta' aċidu idrokloriku alkoholiku), imlahalhin u mnixxfen qabel tużahom sabiex tevita kontaminazzjoni mar-residwi minn testijiet li saru qabel. Il-flasks iridu jtnaddfu anki qabel jintużaw għall-ewwel darba.
17. Evalwa s-sustanzi tat-test fi flasks tad-duplikati fl-istess hin, flimkien ma' flask wiehied għas-sustanza ta' referenza. Aghmel test inbjank, f'duplikat, mingħajr sustanza tat-test u lanqas dik ta' referenza sabiex tistabbilixxi l-inbjanki analitiċi. Dissolvi s-sustanzi tat-test fil-midjum tat-test — jistgħu jiddahhlu b'mod konvenjenti permezz ta' soluzzjoni ewlenija kkonċentrata — biex jingħataw il-konċentrazzjonijiet ta' bidu mixtieqa li normalment ikunu ta' 5-40 mg DOC/l. Ittestja s-sustanza ta' referenza b'mod normali f'konċentrazzjoni tal-bidu li tikkorrispondi għal 20 mg DOC/l. Jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin ta' sustanza tat-test u/jew sustanza ta' referenza, ara li s-salinità tal-midjum tal-ilma baħar ma tinbidilx wisq.
18. Jekk jistgħu jkunu mistennijin effetti tossiċi jew jekk dawn ma jkunux jistgħu jiġu eliminati b'ċertezza, jista' jkun aħjar li fid-disinn tat-test jiġi inkluż esperiment ta' inibizzjoni f'duplikat ukoll. Dahhal is-sustanzi tat-test u ta' referenza fl-istess reċipjent, bil-konċentrazzjoni tas-sustanza ta' referenza li normalment tkun daqs fit-test tal-kontroll (jiġifieri 20 mg DOC/l) sabiex tkun tista' tagħmel paragon.
19. Qassam ammonti adegwati tas-soluzzjonijiet tat-test fil-flasks Erlenmeyer (sa madwar nofs il-volum tal-flask huwa ammont konvenjenti) u mbagħad għatti kull flask b'għatu laxk (eż. fojl tal-aluminju) li jippermetti li jiġi skambjat gass bejn il-flask u l-arja tal-madwar. (Tappijiet magħmulin mit-tajjar mhumieq tajbin jekk tintuża analiżi tad-DOC). Qiegħed ir-reċipjenti fuq ix-xejker u heżżeż kontinwament bil-galbu (eż. 100 rpm) tul it-test kollu. Ikkontrolla t-temperatura (15-20°C u fi hdan ± 2°C), u ipproteġi r-reċipjenti mid-dawl sabiex tevita milli jikbru algi. Ara li l-arja hija hielsa minn materjali tossiċi.

Test fizikokimiku tal-kontroll (mhux obbligatorju)

20. Jekk hemm suspett ta' degradazzjoni abijotika jew mekkaniżmi ta' telf, bħal idrolizi (problema b'analizi speċifika biss), volatilizzazzjoni jew assorbiment, huwa rakkomandat li tagħmel esperiment fizikokimiku tal-kontroll. Dan jista' jsir billi jiddahhal klorur tal-merkurju (II) (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) f'reċipjenti bis-sustanza tat-test sabiex titwaqqaf l-attività mikrobjali. Tnaqqis kbir fid-DOC jew konċentrazzjoni speċifika tas-sustanza fit-test tal-kontroll fizikokimiku jindika mekkaniżmi ta' tneħhija abijotiċi. (Jekk jintuża klorur tal-merkurju, għandha tingħata attenzjoni għal interferenzi jew pożizzjonar katalistiku fl-analiżi tad-DOC.)

Numru ta' flasks

21. F'sensiela tipika ta' testijiet, jintużaw il-flasks li ġejjin:

Flasks 1 u 2 li fihom is-sustanza tat-test (sospensjoni tat-test);

Flasks 3 u 4 li fihom ilma baħar biss (inkbjank);

Flask 5 li fihom is-sustanza ta' referenza (kontroll tal-proċedura);

Flask 6 li fih is-sustanza tat-test u ta' referenza (kontroll tat-tossiċità) — mhux obbligatorju;

Flask 7 li fih is-sustanza tat-test u l-aġent sterelizzanti (kontroll sterili abijotiku)-mhux obbligatorju.

⁽¹⁾ Klorur tal-merkurju (II) (HgCl_2) huwa sustanza ferm tossika li għandha titqandel bil-prekawzjonijiet xierqa. Skart milwiem li fih din is-sustanza kimika għandu jintrema kif xieraq; ma għandux jintrema fis-sistema tal-ilma mormi.

▼ **M6****Analizi tad-DOC**

22. Matul it-test, hu kampjuni kull certu perjodu xieraq ghal analizi tad-DOC (Appendici 1). Dejjem ghandek tiehu kampjuni fil-bidu tat-test (jum 0) u fil-jum 60. Tal-inqas hemm bzonn ta' hames kampjuni b'kollox sabiex jiddeskrivu l-medda ta' zmien tad-degradazzjoni. Ma tista' tigi stabbilita ebda skeda ta' zmien fissa peress li r-rata ta' bijodegradazzjoni tvarja. Iddetermina d-DOC f'duplikat f'kull kampjun.

Kampjunar

23. Il-volum mehtieg tal-kampjuni jiddependi mill-metodu analitiku (analizi specifika), mill-analizzatur tal-karbonju uzat, u mill-procedura (filtrazzjoni tal-membrana jew centrifugazzjoni) maghzulin ghat-trattament tal-kampjun qabel ma jigi stabbilit il-karbonju (paragrafi 25 u 26). Qabel il-kampjunar, ara li l-midjum tat-test ikun imhallat sew u li kwalunkwe materjal imqabbad ma' gewwa tal-flask jinhall jew jigi sospiz.
24. Iffiltra bil-membrana jew iccentrifuga minnufih wara l-kampjunar. Jekk ikun hemm bzonn, ahzen il-kampjuni ffiltrati jew iccentrifugati f'2-4 °C sa 48 siegħa jew inqas -18 °C għal perjodi itwal (jekk ikun magħruf li s-sustanza mhux ser tigi affettwata, acidifikaha sa pH 2 qabel tahzinha).
25. Il-filtri tal-membrana (0,2-0,45 µm) huma xierqa jekk ikun zgurat li la jehilsu karbonju u lanqas ma jassorbu s-sustanza fl-istadju tal-filtrazzjoni, eż. filtri tal-membrana tal-polikarbonat. Ċerti filtri tal-membrana huma mxappin b'agenti tensjoattivi għal idrofilizzazzjoni u jistgħu jehilsu kwantitajiet konsiderevoli ta' karbonju dissolt. Hejji t-tali filtri billi tghallihom filma dejonizzat għal tliet perjodi ta' siegħa konsekuttivi. Wara li tghallihom, ahzen il-filtri filma dejonizzat. Armi l-ewwel 20 ml tal-filtrat.
26. Minflok filtrazzjoni tal-membrana tista' tingħazel centrifugazzjoni tal-kampjuni. Iccentrifuga f'40 000 m.s⁻² (~ 4 000 g) għal 15-il minuta, idealment f'centrifugu mkessah.

Nota: Donnha ma taħdimx id-differenzazzjoni tal-Karbonju Organiku Totali (TOC) mid-DOC (TOC/DOC) b'centrifugazzjoni f'koncentrazzjonijiet baxxi hafna, peress li jew jitnehhewx il-batterji kollha, jew jerga' jigi dissolt il-karbonju bhala parti mill-plażma batterjali. F'koncentrazzjonijiet oghla (> 10 mg C għal kull litri), l-iżball ta' centrifugazzjoni donnu paragonabbilment żgħir.

Frekwenza tal-kampjunar

27. Jekk isiru analizijiet eżatt wara l-kampjunar, ivvaluta ż-żmien biex isir il-kampjunar li jmiss billi tqis ir-riżultat tad-determinazzjoni analitika.
28. Jekk il-kampjuni jinżammu (paragrafu 24) sabiex jiġu analizzati iktar tard, hu iktar kampjuni min-numru minimu mehtieg ta' hamsa. L-ewwel analizza l-aħhar kampjuni, u permezz ta' għażla “b'lura” skont l-istadji tal-kampjuni xierqa għal analizi, huwa possibbli li tikseb deskrizzjoni tajba tal-kurva ta' bijodegradazzjoni b'numru relattivament żgħir ta' determinazzjonijiet analitiċi. Jekk ma tkun seħħet ebda degradazzjoni sa tmiem it-test, ma jkun hemm bzonn li jiġi analizzat ebda kampjun ieħor, u f'din is-sitwazzjoni, l-istrategija “b'lura” tista' tiffranka spejjeż konsiderevoli tal-analizi.

▼ M6

29. Jekk jiġi osservat plateau fuq il-kurva ta' degradazzjoni qabel il-jum 60, temm it-test. Jekk ovvjament id-degradazzjoni bdiet sal-jum 60, iżda għadha ma lahqitx plateau, tawwal l-esperiment għal perjodu itwal.

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

30. Irreġistra r-riżultati analitiċi fuq l-iskeda tad-dejta meħmuża (Appendiċi 2), u kkalkola l-valuri tad-degradazzjoni kemm għas-sustanza tat-test kif ukoll dik ta' referenza mill-ekwazzjoni:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

fejn:

D_t degradazzjoni f'DOC perċentwali jew tneħħija tas-sustanza speċifika fiż-żmien t ,

C_0 bidu tal-konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fil-midjum tat-test,

C_t konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fil-midjum tat-test fiż-żmien t ,

$C_{bl(0)}$ bidu tal-konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fl-inbjank,

$C_{bl(t)}$ konċentrazzjoni tad-DOC jew sustanza speċifika fl-inbjank fiż-żmien t .

31. Iddikjara d-degradazzjoni bħala t -tneħħija tad-DOC perċentwal (degradazzjoni finali) jew tneħħija tas-sustanza speċifika (degradazzjoni primarja) fiż-żmien t . Ikkalkola l-konċentrazzjonijiet tad-DOC sal-eqreb 0,1 mg għal kull litru, u qarrej il-medji tal-valuri D_t sal-eqreb perċentwal shih.
32. Uri kif mexiet id-degradazzjoni fuq grafika f'dijagramma kif muri fil-figura f'“Validità u interpretazzjoni tar-riżultati”. Jekk hemm dejta suffiċjenti, ikkalkola mill-kurva l-fażi tad-dewmien (t_L) u ż-żmien sabiex tintlaħaq tneħħija ta' 50 fil-mija minn tmiem il-fażi ta' dewmien (t_{50}).

Rapport tat-test

33. Ir-rapport tat-test irid ikun fih l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

- l-għamla fiżika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;
- dejta ta' identifikazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

- il-post u d-deskrizzjoni tas-sit ta' kampjunar; status ta' tniġġis u tan-nutrijenti (għadd tal-kolonja, nitrato, ammonijaka, fosfat jekk xieraq);
- il-karatteristiċi tal-kampjun (data tal-kampjunar, fond, dehra, temperatura, salinità, DOC (mhux bilfors), id-dewmien bejn il-ġbir u l-użu fit-test;

▼ M6

- il-metodu użat (jekk jintuża wiehded) sabiex jiqdiem il-baħar;
- il-metodu użat għall-pretrattament (filtrazzjoni/sedimentazzjoni) tal-ilma baħar;
- il-metodu użat għad-determinazzjoni tad-DOC;
- il-metodu użat għall-analiżi speċifika (mhux obbligatorju);
- il-metodu użat għad-determinazzjoni tan-numru ta' eterotrofi fl-ilma baħar (il-metodu tal-ghadd tal-pjastrini jew proċedura oħra) (mhux obbligatorju);
- metodi oħrajn (mhux obbligatorji) użati biex jiġi kkaratterizzat l-ilma baħar (kejliet tal-ATP, eċċ.).

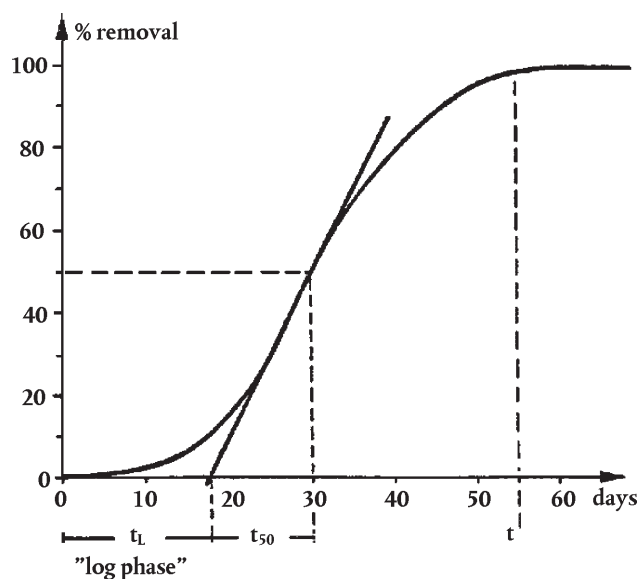
Riżultati:

- dejta analitika rrapportata fuq skeda tad-dejta (Appendiċi 2);
- kif mexxa t-test tad-degradazzjoni huwa rrappreżentat fuq grafika f'diagramma li turi l-fażi ta' dewmien (t_L), inklinazzjoni grafika, u żmien (b'bidu minn tmiem il-fażi ta' dewmien) sabiex tinkiseb tneħħija ta' 50 fil-mija (t_{50}). Il-fażi ta' dewmien tista' tiġi stmata fuq grafika kif muri fil-figura fis-sezzjoni "Validità u interpretazzjoni tar-riżultati" jew għal konvenjenza jista' jintuża ż-żmien mehtieg għal degradazzjoni ta' 10 fil-mija;
- id-degradazzjoni f'perċentwali mkejla wara 60 jum, jew fi tmiem it-test.

*Diskussjoni tar-riżultati.***Validità u interpretazzjoni tar-riżultati**

34. Ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza eż. benzoat tas-sodju, aċetat tas-sodju jew anilina, għandhom ikunu paragonabbli mar-riżultati miksubin fir-ringtest (3) (irreferi għas-sezzjoni dwar is-"Sustanzi ta' referenza", paragrafu 7). Jekk ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza ma jkunux tipiċi, it-test għandu jerga' jsir bl-użu ta' kampjun iehor ta' ilma baħar. Għad li r-riżultati tat-testijiet ta' inibizzjoni mhux dejjem ikun faċli tinterpretahom minhabba l-kontribuzzjoni tad-DOC mis-sustanza tat-test, tnaqqis kbir fir-rata ta' tneħħija tad-DOC totali, meta mqabbla ma' dik tal-kontroll, huwa sinjal pożittiv ta' effetti tossiċi.
35. Minhabba l-konċentrazzjonijiet tat-test relattivament għoljin użati meta mqabblin ma' hafna sistemi naturali (u konsegwentement proporzjon mhux favorevoli bejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test u sorsi oħrajn tal-karbonju), il-metodu għandu jitqies bħala test preliminari li jista' jintuża biex jindika jekk sustanza hijiex faċilment bijodegradabbli. Għalhekk, riżultat baxx mhux bilfors ifisser li s-sustanza tat-test mhijiex bijodegradazzjoni f'ambjenti marittimi, iżda jindika li hemm bżonn isir iktar xogħol sabiex jiġi stabbilit jekk dan huwiex minnu.

Eżempju ta' esperiment ta' degradazzjoni teoriku li juri mod fattibbli ta' kif jistgħu jiġu stmati l-valuri ta' t_L (tul tal-"fażi ta' dewmien") u t_{50} (intervall taż-żmien, li jibda f' t_L), mehtieg sabiex tinkiseb tneħħija ta' 50 fil-mija, huwa mogħti fil-figura ta' hawn taht.

▼ **M6****METODU TAL-FLIXKUN MAGHLUQ****INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu huwa varjant tal-ilma baħar tat-Test tal-Flixkun Maghluq (5) u ġie ffinalizzat wara ringtest organizzat għall-Kummissjoni Ewropea (KE) mill-Istitut Daniż għall-Kwalità tal-Ilma (3).
2. B'mod simili għall-Metodu tal-Flask Mhežżeż, ir-riżultati ta' dan it-test ma għandhomx jitqiesu bħala indikazzjonijiet ta' bijodegradabilità pronta, iżda għandhom jintużaw b'mod speċifiku sabiex tinkiseb informazzjoni dwar il-bijodegradabilità tas-sustanzi f'ambjenti marittimi.

PRINĊIPJU TAL-METODU

3. Ammont prestabbilit tas-sustanza tat-test jiġi dissolt fil-midjum tat-test f'konċentrazzjoni ta', normalment, 2-10 mg tas-sustanza tat-test għal kull litru (tista' tintuża konċentrazzjoni waħda jew iktar). Is-soluzzjoni tinżamm fi flixkin maghluq fid-dlam f'banju ta' temperatura kostanti jew f'post maghluq ikkontrollat sa ± 1 °C fi hdan medda ta' 15-20 °C. F'dawk il-kazijiet li fihom l-oġettiv tal-istudju huwa li jiġsimula sitwazzjonijiet ambjentali, jistgħu jitwettqu testijiet lil hinn minn din il-medda ta' temperatura normali diment li jsiru aġġustamenti xierqa għall-kontroll tat-temperatura. Id-degradazzjoni hija segwita minn analizijiet tal-ossigenu tul perjodu ta' 28 jum.
4. Ir-ringtest wera li jekk it-test ġie estiż lil hinn minn 28 jum, ma tista' tingabar ebda informazzjoni siewja f'hafna kazijiet, minhabba xkiel serju. Il-valuri inbjank tad-domanda bijoloġika ta' ossigenu (BOD) kienu għoljin wisq, aktarx minhabba tkabbir man-naha ta' ġewwa tal-flask, ikkaġunat minn nuqqas ta' thawwid, u nitrifikazzjoni. B'hekk, id-durata rrakkomandata hija ta' 28 jum, iżda jekk il-valur inbjank tal-BOD jibqa' fi hdan il-limitu ta' 30 fil-mija (paragrafi 15 u 40), it-test jista' jittawwal.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

5. Sabiex ikun magħruf jekk it-test jistax jiġi applikat għal sustanza partikolari, iridu jkunu magħrufin uhud mill-karatteristiċi tagħha. Il-formula empirika hija meħtieġa sabiex tkun tista' tiġi kkalkolata d-domanda teorika ta' ossigenu (ThOD) (ara l-Appendiċi 3); inkella, tkun trid tiġi stabbilita d-domanda kimika ta' ossigenu (COD) tas-sustanza sabiex isservi bħala l-valur referenzjarju. L-użu tas-COD huwa inqas sodisfaċenti peress li ċerti sustanzi mhumix kompletament ossidizzati fit-test tas-COD.

▼ M6

6. Is-solubilità tas-sustanza għandha tkun tal-inqas ta' 2 mg/l, għad li fil-prinċipju jistgħu jiġu ttestjati sustanzi inqas solubbli (eż. bl-użu ta' ultrasonifikazzjoni) u hekk ukoll sustanzi volatili. Informazzjoni dwar il-purità jew il-proporzjonijiet relattivi tal-komponenti l-kbar tas-sustanza tat-test hija meħtieġa sabiex ikunu jistgħu jiġu interpretati r-riżultati miksubin, speċjalment meta r-riżultat ikun qrib il-livell ta' "suċċess".
7. Informazzjoni dwar it-tossicità tas-sustanza għall-batterji, eż. kif imkejla fit-testijiet ta' respirazzjoni fuq terminu qasir (4) tista' tkun ferm siewja meta jingħaḥlu konċentrazzjonijiet xierqa tat-test u tista' tkun essenzjali għall-interpretazzjoni korretta ta' valuri baxxi ta' bijodegradazzjoni. Madankollu, it-tali informazzjoni mhijiex dejjem biżżejjed sabiex jiġu interpretati r-riżultati miksubin fit-test ta' bijodegradazzjoni u l-proċedura deskritta fil-paragrafu 27 hija iktar adattata.

SUSTANZI TA' REFERENZA

8. Iridu jintużaw sustanzi ta' referenza adattati sabiex tiġi vverifikata l-attività mikrobjali tal-kampjun ta' ilma baħar. Għal dan il-ghan jistgħu jintużaw anilina, aċetat tas-sodju jew benzoat tas-sodju (pereżempju). Trid issehh degradazzjoni ta' dawn is-sustanzi ta' tal-inqas 60 fil-mija (tat-ThOD tagħhom) fi hdan perjodu raġonevolment qasir, inkella huwa rrakkomandat li t-test jerga' jsir billi jintuża kampjun iehor tal-ilma baħar.
9. Fir-ringtest tal-KE, li fih il-kampjuni ta' ilma baħar ittiedu minn postijiet differenti u fi żminijiet differenti tas-sena, il-fażi ta' dewmien (t_L) u ż-żmien sakemm tinkiseb degradazzjoni ta' 50 fil-mija (t_{50}), eskluża l-fażi tad-dewmien, kienu ta' 0 sa jumejn u jum sa 4 rispettivament għall-benzoat tas-sodju. Għall-anilina, il-valuri ta' t_L u t_{50} kienu ta' 0 sa 7 u jumejn sa 12-il jum rispettivament.

RIPRODUCIBILITÀ

10. Ir-riproducibilità tal-metodi ġiet stabbilita fir-ringtest tal-KE (3).

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Apparat**

11. Tagħmir normali tal-laboratorju u:
 - (a) jistgħu jintużaw fliexken tal-BOD tal-250-300 ml b'tappijiet tal-ħgieġ jew fliexkun b'għonq dejjaq tal-250 ml b'tappijiet tal-ħgieġ;
 - (b) Bosta fliexken taż-2, it-3 u l-4 litri b'marki tal-litri għat-thejjiija tal-esperiment u għall-mili tal-fliexken tal-BOD;
 - (c) Banjumarija jew kamra b'temperatura kostanti għaž-żamma tal-fliexken f'temperatura kostanti (± 1 °C) bl-esklużjoni tad-dawl.
 - (d) Tagħmir għall-analizi tal-ossigenu dissolt;
 - (e) Filtri tal-membrana, 0,2-0,45 μ m (mhux obbligatorji);
 - (f) Tagħmir għal analizi speċifika (mhux obbligatorju).

Ilma baħar

12. Hu kampjun ta' ilma baħar f'kontenitur maħsul sew u hu du fil-laboratorju, idealment fi żmien jum jew tnejn mit-tehid. Matul it-trasportar, thallix it-temperatura tal-kampjun taqbeż wisq it-temperatura li ser tintuża fit-test.

▼ **M6**

13. Identifika l-post tal-kampunar bi preċiżjoni u ddeskrivih f'termini tal-istatus ta' tnigġis u nutrizzjonali tiegħu. B'mod partikolari għal ilmijiet tal-kosta jew imniġġsin, f'din il-karatterizzazzjoni għandek tinkludi għadd tal-kolonja mikrobjali eterotrofika u d-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet ta' nitrat, ammonijaka u fosfat dissolti.
14. Ipprovdli l-informazzjoni li ġejja għall-kampjun ta' ilma baħar stess:
- id-data tat-tehid;
 - il-fond tat-tehid;
 - id-dehra tal-kampjun — imċajpar eċċ.;
 - it-temperatura fil-ħin tat-tehid;
 - is-salinità;
 - il-karbonju organiku dissolt (DOC);
 - id-dewmien bejn it-tehid u l-użu fit-test.
15. Jekk jinstab li l-kontenut tad-DOC tal-kampjun huwa għoli jew jekk huwa maħsub li l-BOD inbjack wara 28 jum għandha tkun iktar minn 30 fil-mija ta' dik tas-sustanzi ta' referenza, huwa rrakkomandat li l-ilma baħar jithalla jiqdiem għal madwar ġingħa qabel jintuza.
16. Halli l-kampjun jiqdiem billi taħżnu f'kundizzjonijiet aerobiċi fit-temperatura tat-test u fid-dlam jew f'dawl bati. Jekk hemm bżonn, żomm il-kundizzjonijiet aerobiċi billi tagħtih fit arja. Meta jkun qed jiqdiem, jonqos il-kontenut ta' materjal organiku faċilment degradabbli. Fir-ringtest (3), ma nstabet ebda differenza bejn il-potenzjal ta' degradazzjoni tal-kampjun ta' ilma baħar li thalla jiqdiem u dak ta' ilma baħar miġbur frisk.
17. Qabel tużah, ittratta l-ilma baħar minn qabel sabiex tneħhi l-partikoli horox, eż. permezz ta' filtrazzjoni minn filtru tan-najlon jew karta filtru harxa (mhux filtri tal-GF-C jew membrana), jew permezz ta' sedimentazzjoni u dekantar. Irrapporta l-proċedura użata. Ittrattah minn qabel wara li jiqdiem, jekk jintuza.

Soluzzjonijiet ewlenin għal nutrijenti minerali

18. Hejji s-soluzzjonijiet ewlenin li ġejjin bl-użu ta' reagenti tal-grad analitiku:
- | | | |
|-----|--|---------|
| (a) | Potassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Dipotassju idroġenu ortofosfat, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Disodju idroġenu ortofosfat diidrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 33,30 g |
| | Klorid tal-ammonium, NH_4Cl | 0,50 g |
| | Holl u tella' sa litru b'ilma distillat. | |
| (b) | Klorur tal-kalċju, CaCl_2 | 27,50 g |
| | Holl u tella' sa litru b'ilma distillat. | |
| (c) | Eptaidrat tas-sulfat tal-magneżju, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Holl u tella' sa litru b'ilma distillat. | |
| (d) | Hadid (III) eksaidrat tal-klorid, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Holl u tella' sa litru b'ilma distillat. | |

▼ **M6**

Precipitazzjoni fis-soluzzjoni (d) tista' tiġi evitata billi tiżdied qatra ta' HCl ikkoncentrat jew 0,4 g etilenedjamine-tetra-aċidu aċetiku (EDTA, melh disodju) għal kull litru. Jekk jiffurma precipitat f'soluzzjoni ewlenija, ibdilha ma' soluzzjoni magħmula għida.

Thejjija tal-midjum tat-test

19. Għal kull litru ilma baħar pretrattat, żid 1 ml ta' kull waħda mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' hawn fuq. Issatura l-midjum tat-test b'arja fit-temperatura tat-test billi tagħtih l-arja b'arja kkompressata nadifa għal madwar 20 minuta. Iddetermina l-koncentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għal skopijiet ta' kontroll. Il-koncentrazzjoni saturata ta' ossiġenu dissolt bħala funzjoni tas-salinità u t-temperatura tista' tingara min-nomogramma inkorporata ma' dan il-metodu ta' ttestjar (Appendiċi 4).

Inokulu

20. Izzidx inokulu speċifiku minbarra l-mikroorganizmi diġà preżenti fl-ilma baħar. Iddetermina (mhux bilfors) in-numru ta' eterotrofi li jiffurmaw kolonja fil-midjum tat-test ta' ilma baħar (u idealment anki fil-kampjun ta' ilma baħar oriġinali), eż. bl-għadd tal-pjastrini bl-użu ta' agar marittimu. Dan ikun ideali b'mod partikolari għal kampjuni minn siti kostali jew inniġġsin. Ivverifika l-attività mikrobjali eterotrofica fl-ilma baħar billi tagħmel test b'sustanza ta' referenza.

Thejjija tal-fliexken tat-test

21. Aghmel il-manipolazzjonijiet meħtieġa kollha inkluż li thalli l-ilma baħar jiqdiem u tittrattah minn qabel fit-temperatura magħżula tat-test ta' bejn 15 u 20 °C, filwaqt li tiżgura li jkun hemm indafa, izda mhux sterilità tal-oġġetti kollha tal-ħġieġ.
22. Hejji l-gruppi ta' fliexken tal-BOD sabiex issib il-BOD tat-test u s-sustanzi ta' referenza f'sensiela sperimentali simultanja. Aghmel l-analizijiet kollha fuq fliexken ta' duplikati (sustanzi inbjank, ta' referenza u tat-test), jiġifieri hejji żewġ fliexken għal kull determinazzjoni. Aghmel analizijiet tal-inqas fil-jiem 0, 5, 15 u 28 (erba' determinazzjonijiet). Għal analizijiet tal-ossiġenu, erba' determinazzjonijiet jeħtieġu total ta' $3 \times 2 \times 4 = 24$ fliexkun (sustanzi inbjank, ta' referenza u tat-test), u b'hekk madwar 8 litri tal-midjum tat-test (għal koncentrazzjoni waħda tas-sustanza tat-test).
23. Hejji soluzzjonijiet separati tas-sustanzi tat-test u ta' referenza fi fliexken kbar ta' volum suffiċjenti (paragrafu 11) billi l-ewwel iżżid is-sustanzi tat-test u ta' referenza jew direttament jew billi tuża soluzzjoni ewlenija kkoncentrata fil-fliexken il-kbar mimlijin f'parti minnhom. Żid midjum tat-test iehor sabiex tagħti l-koncentrazzjonijiet finali mixtieqa. Jekk jintużaw is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanzi tat-test u/jew ta' referenza, ara li s-salinità tal-midjum tal-ilma baħar ma tinbidilx wisq.
24. Aghżel koncentrazzjonijiet tas-sustanzi tat-test u ta' referenza billi tiehu f'kunsiderazzjoni:
 - (a) is-solubilità tal-ossiġenu dissolt fl-ilma baħar fit-temperatura u s-salinità prevalenti tat-test (ara n-nomogramma inkorporata — Appendiċi 4);
 - (b) il-BOD inbjank tal-ilma baħar; u
 - (c) il-bijodegradabilità mistennija tas-sustanza tat-test.

▼ **M6**

25. Fi 15 °C u 20 °C u salinità ta' 32 parti għal kull elf (ilma tal-oċean), is-solubilità tal-ossiġenu dissolt hija ta' madwar 8,1 u 7,4 mg/l rispettivament. Il-konsum tal-ossiġenu tal-ilma baħar stess (respirazzjoni inbjank) jista' jkun ta' 2 mg O₂/l jew iktar, jekk l-ilma baħar ma jithalliex jiqdiem. Għaldaqstant, sabiex tiżgura li jkun fadal konċentrazzjoni sinifikanti ta' ossiġenu wara l-ossidazzjoni tas-sustanza tat-test, uża konċentrazzjoni tal-bidu tas-sustanza tat-test ta' madwar 2-3 mg/l (skont it-ThOD) għas-sustanzi li huma mistennjin jiġu degradati bis-shih fil-kundizzjonijiet tat-test (bħal sustanzi ta' referenza). Ittestja sustanzi inqas degradabbli f'konċentrazzjonijiet oghla, sa madwar 10 mg/l, diment li ma jsehhux effetti tossiċi. Jista' jkun ta' vantaġġ li jsiru testijiet paralleli b'konċentrazzjoni baxxa (madwar 2 mg/l) u għolja (madwar 10 mg/l) tas-sustanza tat-test.
26. Irid jiġi stabbilit inbjank tal-ossiġenu b'mod parallel fi fliexken li la fih sustanza tat-test u lanqas ta' referenza.
27. Jekk iridu jiġu stabbiliti effetti inibitorji, hejji s-sensiela li ġejja ta' soluzzjonijiet fi fliexken kbar separati (paragrafu 13):
- (a) 2 mg għal kull litru ta' sustanza faċilment degradabbli, eż. kwalunkwe waħda mis-sustanzi ta' referenza msemmijin;
 - (b) x mg għal kull litru tas-sustanza tat-test (normalment x huwa 2);
 - (c) 2 mg għal kull litru tas-sustanza faċilment degradabbli flimkien ma' x mg għal kull litru tas-sustanza tat-test.

Test tal-kontroll fiżikokimiku (mhux obligatorju)

28. Jekk tintuża l-possibbiltà li jintużaw analizijiet speċifiċi, jista' jsir esperiment fiżikokimiku sabiex jiġi vverifikat jekk is-sustanza tat-test tneħħiha permezz ta' mekkaniżmi abijotiċi, bħal idrolizi jew assorbiment. Test tal-kontroll fiżikokimiku jista' jsir billi jiżdied klorur tal-merkurju (II) (HgCl₂)⁽¹⁾ (50-100 mg/l) fi flasks ta' duplikati b'sustanza tat-test sabiex titwaqqaf l-attività mikrobjali. Tnaqqis sinifikanti fil-konċentrazzjoni tas-sustanza speċifika matul it-test jindika mekkaniżmi ta' tneħħija abijotiċi.

Numru ta' fliexken tal-BOD f'testijiet tipiċi

29. F'testijiet tipiċi jintużaw il-fliexken li ġejjin:
- tal-inqas 8 li fihom is-sustanza tat-test;
 - tal-inqas 8 li fihom ilma baħar miżjud bin-nutrijenti biss;
 - tal-inqas 8 li fihom is-sustanza ta' referenza, u meta jkun hemm bżonn
 - 6 fliexken li fihom is-sustanza tat-test u ta' referenza (kontroll tat-tossiċità).

PROCEDURA

30. Wara t-thejjija, battal kull soluzzjoni minnufih, mill-kompartiment inferjuri (mhux mill-qiegħ) tal-flixkun il-kbir xieraq, biex timla l-grupp rispettiv tal-fliexken tal-BOD. Minnufih għandek tanalizza l-kontrolli żero (żmien żero) għal ossiġenu dissolt (paragrafu 33) jew zommhom għal analiżi kimika iktar tard permezz ta' preċipitazzjoni b'MnCl₂ (klorur tal-manjeżju (II)) u NaOH (idrossidu tas-sodju).

⁽¹⁾ Klorur tal-merkurju (II) (HgCl₂) huwa sustanza ferm tossika li għandha titqandel bil-prekawżjonijiet xierqa. Skart milwiem li fih din is-sustanza kimika għandu jintrema kif xieraq; ma għandux jintrema direttament fis-sistema ta' ilma mormi.

▼ **M6**

31. Inkuba l-fliexken paralleli tal-BOD li jifdal fit-temperatura tat-test (15-20 °C), żommhom fid-dlam, u nehhihom miż-zona ta' inkubazzjoni f'intervalli xierqa ta' hin (eż. tal-inqas wara 5, 15 u 28 jum) u analizzahom għal ossiġenu dissolt (paragrafu 33).
32. Filtru tal-membrana (0,2-0,45 µm) jew iċċentrifuga, għal 15-il minuta, il-kampjuni għal analizijiet speċifiċi (mhux obbligatorji). Ahżinhom għal 48 siegħa f'2-4 °C, jew għal perjodi itwal fi -18 °C, jekk mhux analizzati minnufih (jekk mhuwiex magħruf li s-sustanza tat-test mhix ser tkun affettwata, aċidifika għal pH 2 qabel ma tahżinhom).

Determinazzjoni tal-ossiġenu dissolt

33. Iddetermina l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt billi tuża metodu kimiku jew elettrokimiku li huwa rikonoxxut flivell nazzjonali jew internazzjonali.

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-Riżultati**

34. Irreġistra r-riżultati analitiċi fuq l-iskedi ta' dejta mehmuzin (Appendiċi 5).
35. Ikkalkola l-BOD bħala d-differenza tat-tnaqqis tal-ossiġenu bejn inbjank u soluzzjoni tas-sustanza tat-test fil-kundizzjonijiet tat-test. Aqsam it-tnaqqis tal-ossiġenu nett bil-konċentrazzjoni (w/v) tas-sustanza sabiex tesprimi l-BOD bħala mg BOD/mg sustanza tat-test. Id-degradazzjoni hija ddefinita bħala l-proporzjon tad-domanda bijokimika ta' ossiġenu, idealment, meta mqabbla mad-domanda teorika ta' ossiġenu (ThOD) jew id-domanda kimika ta' ossiġenu (COD) u mogħtija bħala perċentwal (ara l-paragrafu 36).
36. Ikkalkola l-valuri ta' bijodegradazzjoni għal kull żmien ta' kampjunar kemm għas-sustanza tat-test u ta' referenza billi tuża waħda mill-ekwazzjonijiet:

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg tested substance}}{\text{mg ThOD} / \text{mg tested substance}} \times 100$$

$$\% \text{ biodegradation} = \frac{\text{mg } O_2 / \text{mg tested substance}}{\text{mg COD} / \text{mg tested substance}} \times 100$$

fejn:

ThOD = domanda teorika ta' ossiġenu (kalkolu, Appendiċi 3)

COD = domanda kimika ta' ossiġenu, iddeterminata b'mod sperimentali.

Nota: Kultant, iż-żewġ modi ta' kalkolu (perċentwal tat-ThOD jew perċentwal tas-COD) ma jagħtux l-istess riżultati; huwa ppreferut l-użu tat-ThOD, peress li whud mis-sustanzi mhumix kompletament ossidizzati fit-test tas-COD.

37. Uri kif mexxa t-test ta' degradazzjoni fuq grafika f'dijagramma (ara l-eżempju fis-sezzjoni dwar "Validità u interpretazzjoni tar-riżultati". Jekk hemm biżżejjed dejta, ikkalkola l-faži ta' dewmien (t_1) u ż-żmien (t_{50}) sabiex tintlaħaq tnehhija ta' 50 fil-mija minn tmiem il-faži ta' dewmien mill-kurva ta' bijodegradazzjoni.
38. Jekk tintuża analiżi speċifika (mhux bilfors), iddikjara l-perċentwal tad-degradazzjoni primarja bħala l-perċentwal tat-tnehhija ta' sustanza speċifika fi hdan il-perjodu tat-test (ikkoreġi għal inbjanki analitiċi).

▼ **M6****Rapport tat-Test**

39. Ir-rapport tat-test irid ikun fih l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

- l-għamla fizika u, fejn relevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;
- dejta ta' identifikazzjoni.

Kundizzjonijiet tat-test:

- il-post u d-deskrizzjoni tas-sit tal-kampjunar: status ta' tniġġis u nutrizzjoni (għadd tal-kolonja, nitrat, ammonijaka, fosfat jekk xieraq);
- il-karatteristiċi tal-kampjun (data tal-kampjunar, fond, dehra, temperatura, salinità, DOC (mhux bilfors), dewmien bejn it-tehid u l-użu fit-test);
- il-metodu użat (jekk intuża wiehed) sabiex jiġi qid l-ilma baħar;
- il-metodu użat għall-pretrattament (filtrazzjoni/sedimentazzjoni) tal-ilma baħar;
- il-metodu użat għad-determinazzjoni tas-COD (jekk issir);
- il-metodu użat għall-kejl tal-ossigenu;
- il-proċedura ta' dispersjoni għas-sustanzi li fitt li xejn huma solubbli fil-kundizzjonijiet tat-test;
- il-metodu użat sabiex jiġi stabbilit in-numru ta' eterotrofi fl-ilma baħar (il-metodu ta' għadd tal-pjastrini jew proċedura oħra);
- il-metodu użat għad-determinazzjoni tad-DOC fl-ilma baħar (mhux bilfors);
- il-metodu użat għal analiżi speċifika (mhux bilfors);
- metodi mhux obligatorji oħrajn użati sabiex jiġi kkaratterizzat l-ilma baħar (kejl tal-ATP, eċċ.).

Riżultati:

- dejta analitika rrapportata fuq skeda ta' dejta (kif mehmuża, Appendiċi 5);
- matul it-test ta' degradazzjoni rrapprezentat fuq grafika f'dijagramma li turi l-fażi ta' dewmien, (t_L), l-inklinazzjoni grafika u ż-żmien (b'bidu minn tmiem il-fażi ta' dewmien) sakemm jintlaħaq tehid ta' 50 fil-mija tat-tehid ta' ossigenu finali b'ossidazzjoni tas-sustanza tat-test (t_{50}). Il-fażi ta' dewmien tista' tiġi stmata fuq grafika kif muri fil-figura mehmuża, jew għal konvenjenza tittiehed bħala ż-żmien mehtieg għal degradazzjoni ta' 10 fil-mija;
- id-degradazzjoni perċentwali mkejla wara 28 jum.

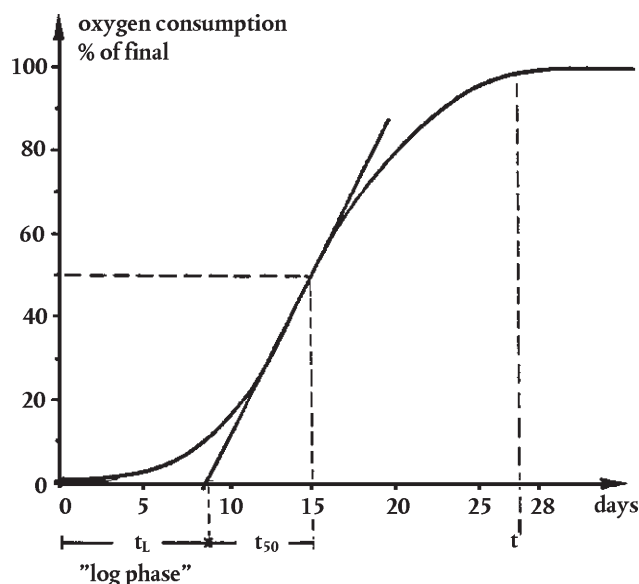
*Diskussjoni tar-riżultati***Validità u interpretazzjoni tar-riżultati**

40. Ir-respirazzjoni inbjank ma għandhiex taqbeż it-30 fil-mija tal-ossigenu fil-flixkun tat-test. Jekk ma jkunx possibbli li jiġi ssodisfat dan il-kriterju bl-użu ta' ilma baħar mehud frisk, l-ilma baħar irid jithalla jiqdiem (jistabbilizza) qabel jintuża.
41. Trid tiġi kkunsidrata l-possibbiltà li sustanzi li fihom nitroġenu jaffettwaw ir-riżultati.

▼ M6

42. Ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza benzoat tas-sodju u anilina għandhom ikunu paragunabbli mar-riżultati miksubin fir-ringtest (3) (para-grafu 9). Jekk ir-riżultati miksubin bis-sustanzi ta' referenza jkunu atipici, it-test għandu jerga' jsir bl-użu ta' kampjun ieħor ta' ilma baħar.
43. Is-sustanza tat-test tista' titqies li hija inibitorja għall-batterji (fil-konċentrazzjoni użata) jekk il-BOD tat-tahlita tas-sustanza ta' referenza u dik tat-test tkun inqas mis-somma tal-BOD tas-soluzzjonijiet separati taż-żewġ soluzzjonijiet.
44. Minhabba l-konċentrazzjonijiet tat-test relattivament għoljin meta mqabblin ma' hafna mis-sistemi naturali, u konsegwentement minhabba proporzjon favorevoli bejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u sorsi tal-karbonju oħrajn, il-metodu għandu jitqies bħala test preliminari li jista' jintuża sabiex jiġi indikat jekk sustanza hijiex faċilment bijodegradabbli jew le. Għalhekk, riżultat baxx mhux bilfors ifisser li s-sustanza tat-test mhijiex bijodegradazzjoni f'ambjenti marittimi, iżda jindika li hemm bżonn isir iktar xogħol sabiex jiġi stabbilit jekk dan huwiex minnu.

Eżempju ta' esperiment teoriku ta' degradazzjoni li juri mod fattibbli kif jiġu stmati l-valuri ta' t_L (tul tal-“fażi ta' dewmien”) u t_{50} , l-intervall taż-żmien (b'bidu minn t_L), meħtieġ sabiex jintlaħaq teħid finali ta' 50 % tal-ossigenu kkaġunat minn ossidazzjoni tas-sustanza tat-test, jingħata hawn taħt:



LETTERATURA

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
- (2) Il-Kapitolu C.4-B ta' dan l-Anness: Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità “Lesta” Parti III Test ta' Tgħarbil tal-OECD Immodifikat
- (3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.
- (4) Il-Kapitolu C.11 ta' dan l-Anness: Bijodegradazzjoni — Hama Attivata, Test tal-Inibizzjoni tat-Tehid tan-Nifs.
- (5) Il-Kapitolu C.4-D ta' dan l-Anness: Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità “Lesta” Parti VI. Test tal-Flixkun Magħluq.

▼ **M6***Appendiċi 1***Determinazzjoni tal-karbonju organiku fl-ilma bahar****METODU TAL-FLASK MHEŻŻEŻ**

Ghad-determinazzjoni tal-karbonju organiku ta' kampjun ta' ilma, il-komposti organiċi fil-kampjun huma ossidizzati għal diossidu tal-karbonju, ġeneralment bl-użu ta' wahda mit-tliet tekniki li ġejjin:

- ossidazzjoni mxarrba b'persulfat/irradjazzjoni tal-UV;
- ossidazzjoni mxarrba b'persulfat/temperatura għolja (116-130 °C);
- kombustjoni.

CO₂ evolut huwa kkwantifikat billi tithaddem titrimetrija jew spettrometrija infra-ħamra. Inkella, CO₂ jitnaqqas għal metan, li huwa kkwantifikat fuq detettur tal-jonizzazzjoni tal-fjamma (FID).

Il-persulfat/metodu tal-UV jintuża spiss għall-analizi tal-ilma “nadiġ” b'kontenut baxx ta' materja partikolata. L-aħħar żewġ metodi jistgħu jiġu applikati għal ħafna mit-tipi ta' kampjuni ta' ilma, il-persulfat/l-ossidazzjoni tat-temperatura għolja li huma l-iktar xierqa għal kampjuni b'livell baxx, u t-teknika ta' kombustjoni li tapplika għal kampjuni b'kontenut ta' karbonju organiku mhux volatili (NVOC) ferm oġġla minn 1 mg C/l.

Interferenzi

It-tliet metodi kollha kemm huma jiddependu mill-eliminazzjoni jew il-kumpens għal karbonju inorganiku (IC) preżenti fil-kampjun. It-tneħħija tas-CO₂ mill-kampjun aċidifikat huwa l-iktar metodu użat spiss biex jiġi eliminat l-IC, għad li dan jirriżulta wkoll f'telf ta' komposti organiċi volatili (1). It-tneħħija shiħa jew il-kumpens tal-IC iridu jiġu żgurati għal kull matriċi tal-kampjun, u karbonju organiku volatili (VOC) irid jiġi stabbilit minbarra l-NVOC li jiddependi mit-tip ta' kampjun.

Konċentrazzjonijiet għoljin ta' klorur jirriżultaw f'effiċjenza mnaqqsa ta' ossidizzazzjoni bl-użu ta' persulfat/metodu tal-UV (2). Madankollu, l-applikazzjoni ta' reagent ta' ossidizzazzjoni mmodifikat biż-żieda tan-nitrat tal-merkurju (II) tista' tneħħi din l-interferenza. Huwa rrakkomandat li l-volum massimu tollerabbli tal-kampjun jintuża sabiex jiġi evalwat kull tip ta' kampjun li fih il-klorur. Konċentrazzjonijiet għoljin ta' melħ fil-kampjun analizzati bl-użu tal-metodu ta' kombustjoni jistgħu jikkawżaw kisi bil-melħ tal-katalist u korrozzjoni eċċessiva tat-tubu ta' kombustjoni. Għandhom jittiehdu prekawzjonijiet skont il-manwal tal-manifattur.

Kampjuni ferm imċajprin kif ukoll kampjuni li fihom materja partikolata jistgħu jiġu ossidizzati mhux b'mod totali meta jithaddem il-persulfat/metodu tal-UV.

Eżempju ta' metodu xieraq

Karbonju organiku mhux volatili huwa stabbilit permezz ta' ossidizzazzjoni b'persulfat/irradjazzjoni tal-uv u kwantifikazzjoni sussegwenti tas-CO₂ evolut bl-użu ta' spettrometrija infraħamra mhux dispersiva.

Ir-reagent ta' ossidizzazzjoni huwa mmodifikat skont is-suggerimenti mogħtjin f'(2) kif deskritt fil-manwal tal-manifattur:

- a) 8,2 g HgCl₂ u 9,6 g Hg(NO₃)₂ H₂O huma dissolti f'diversi mijiet ta' millilitri ta' ilma reagent b'konċentrazzjoni baxxa tal-karbonju.
- b) 20 g K₂S₂O₈ huma dissolti fis-soluzzjoni ta' melħ merkuriku.

▼ M6

c) 5 ml HNO_3 (konċ.) jiżdiedu mat-tahlita.

d) ir-reagent jiġi dilwit għal 1 000 ml.

L-interferenza mill-klorur jitneħħa bl-użu ta' volum tal-kampjun ta' 40 μl għal 10 fil-mija klorur u volum tal-kampjun ta' 200 μl għal 1,9 fil-mija klorur. Kampjuni ta' konċentrazzjonijiet għoljin ta' klorur u/jew volumi ikbar tal-kampjun jistgħu jiġu analizzati skont dan il-metodu diment li tiġi evitata akkumulazzjoni tal-klorur fir-reċipjent ta' ossidazzjoni. Imbagħad jista' jiġi stabbilit il-karbonju organiku volatil, jekk relevanti, għat-tip ta' kampjun inkwistjoni.

LETTERATURA

- (1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.
- (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Ta' interess ukoll (jiddeskrivi sistema ta' awtoanalizi):

- (3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

▼ **M6***Appendiċi 2***Bijodegradazzjoni fl-ilma bahar**

METODU TA' FLASK MHEŻŻEŻ

SKEDA TAD-DEJTA

1. **LABORATORJU:**2. **DATA FIL-BIDU TAT-TEST:**3. **SUSTANZA TAT-TEST:**

Isem:

Konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija: mg/l bħala sustanza

Konċentrazzjoni inizjali fil-midjum, t_0 : mg/l bħala sustanza

: mg DOC/l

4. **ILMA BAHAR:**

Is-sors:

Id-data tat-tehid:

Il-fond tat-tehid:

Id-dehra f'hin it-tehid (eż. imċajpar, eċċ.):

Is-salinità fit-tehid: ‰

It-temperatura fit-tehid: °C

Id-DOC "x" sigħat wara t-tehid: mg/l

Il-pretrattament qabel l-ittestjar (eż. filtrazzjoni, sedimentazzjoni, zmien kemm thalla jiqdiem, eċċ.):

L-ghadd tal-kolonja mikrobjali — kampjun originali: kolonji/ml

— fil-bidu tat-test: kolonji/ml

Karatteristiċi oħrajn:

5. **DETERMINAZZJONIJIET TAL-KARBONJU:**

Analizzatur tal-karbonju:

	Nru tal-flask		DOC wara n jiem (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: ilma bahar miżjud bin-nutrijenti bis-sustanza tat-test	1	a_1					
		a_2					
		medja, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		medja, $C_{b(t)}$					

▼ **M6**

	Nru tal-flask		DOC wara n jiem (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Inbjank: ilma bahar miżjud bin-nutrijenti minghajr is-sustanza tat-test	1	c ₁					
		c ₂					
		medja, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		medja, C _{d(t)}					
	medja, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **EVALWAZZJONI TAD-DEJTA MHUX IPPROĊESSATA:**

Nru tal-Flask	Kalkolu tar-riżultati	% Degradazzjoni wara n jiem				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Medja (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Ma għandhiex tingħata l-medja ta' D₁ u D₂ jekk ikun hemm differenza konsiderevoli.

Nota: Jistgħu jintużaw formats simili meta d-degradazzjoni tkun segwita minn analiżi speċifika u għas-sustanza ta' referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **DEGRADAZZJONI ABIJOTIKA (mhux obbligatorja)**

	Žmien (jiem)	
	0	t
Konċ. tad-DOC (mg/l) fil-kontroll sterili	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼ **M6***Appendiċi 3***Kalkolu tad-domanda teorika bijokimika ta' ossiġenu****METODU TAL-FLIXKUN MAGĦLUQ**

It-ThOD tas-sustanza $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ tal-piż molekolari MW hija kkal-kolata skont:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Dan il-kalkolu jimplika li C huwa mineralizzat għal CO_2 , H sa H_2O , P sa P_2O_5 u Na to Na_2O . L-alogeni huwa eliminat bħala alogenuri tal-idroġenu u nitroġenu bħala ammobjjaka.

Eżempju:

Glukożju $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2 / \text{mg glucose}$$

Il-piżijiet molekolari tal-melħiet għajr dawk tal-metalli alkali huma kkalkolati fuq is-suppożizzjoni li l-melħiet ġew idrolizzati.

Il-kubrit huwa supponut li huwa ossidizzat għall-istat ta' + 6.

Eżempju:

Sodium n-dodecylbenzenesulphonate $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2 / \text{mg substance}$$

Fil-każ ta' sustanzi li fihom nitroġenu, in-nitroġenu jista' jiġi eliminat bħala ammonijaka, nitrit, jew nitrat li jikkorrispondi għal domandi bijokimiċi teorici differenti ta' ossiġenu.

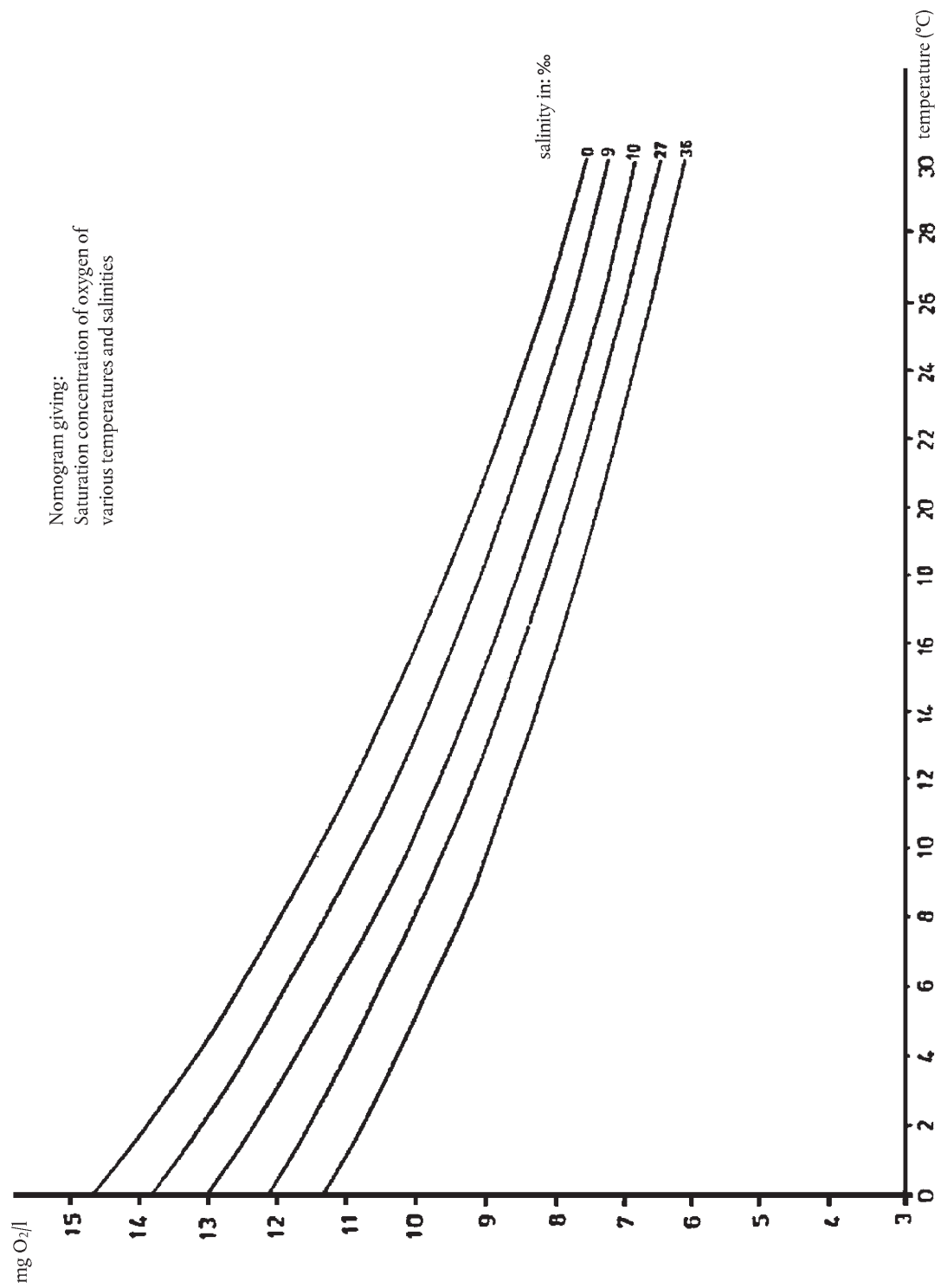
$$ThOD_{NO2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Jekk tiġi osservata formazzjoni ta' nitrat shiħ permezz ta' analizi fil-każ tat-tieni amina:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2 / \text{mg substance}$$

▼ **M6***Appendix 4*

▼ **M6***Appendiċi 5***Bijodegradazzjoni fl-ilma baħar**

METODU TAL-FLIXKUN MAGHLUQ

SKEDA TAD-DEJTA

1. **LABORATORJU:**2. **DATA FIL-BIDU TAT-TEST:**3. **SUSTANZA TAT-TEST:**

Isem:

Konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija:	mg/l
Konċ. inizjali fil-midjum ta' ilma baħar:	mg/l
ThOD jew COD:	mg O ₂ /mg sustanza tat-test

4. **LMA BAHAR:**

Is-sors:

Id-data tat-tehid:

Il-fond tat-tehid:

Id-dehra f'hin it-tehid (eż. imċajpar, eċċ.):

Is-salinità fit-tehid:	‰
It-temperatura fit-tehid:	°C
Id-DOC "x" sigħat wara t-tehid:	mg/l

Il-pretrattament qabel l-ittestjar (eż. filtrazzjoni, sedimentazzjoni, żmien kemm thalla jiqdiem, eċċ.):

L-ghadd tal-kolonja — kampjun oriġinali:	kolonji/ml
mikrobjali — fil-bidu tat-test:	kolonji/ml

Karatteristiċi oħrajn:

5. **MIDJUM TAT-TEST:**

It-temperatura wara l-ghoti tal-arja: °C

Il-konċentrazzjoni tal-O₂ wara l-ghoti tal-arja u l- qagħda qabel jibda t-test: mg O₂/l6. **DETERMINAZZJONI TAD-DO:**

Metodu: Winkler/elettrodu

	Nru tal-flask		mg O ₂ /l wara n jiem			
			0	5	15	28
Test: nutrijent — ilma baħar miżjud bis-sustanza tat-test	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Test medju	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼ **M6**

	Nru tal-flask		mg O ₂ /l wara n jiem			
			0	5	15	28
Inbjank: nutrijent — ilma baħar miżjud, iżda mingħajr is-sustanza tat-test	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Inbjank medju	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Nota: Jista' jintuza format simili għas-sustanza ta' referenza u l-kontrolli tat-tossiċità.

7. **TNAQQIS TAD-DO: % DEGRADAZZJONI (%D):**

	It-tnaqqis tad-DO wara n jiem		
	5	15	28
$(m_b - m_t)^{(1)}$			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{\text{test substance (mg/l)} \times \text{ThOD}} \times 100$			

- ⁽¹⁾ Dan jissuponi li $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, fejn
 $m_{b(0)}$ = il-valur inbjank fil-jum 0,
 $m_{t(0)}$ = il-valur tas-sustanza tat-test fil-jum 0.
 Jekk $m_{b(0)}$ mhux daqs $m_{t(0)}$, uża $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$, fejn
 $m_{b(x)}$ = il-valur inbjank fil-jum x,
 $m_{t(x)}$ = il-valur tas-sustanza tat-test fil-jum x.

▼ M6

C.43. IL-BIODEGRADABILITÀ ANEJROBIKA TAS-SUSTANZI ORGANIČI FIL-HAMA DIĠESTITA: BIL-KEJL TAL-PRODUZZJONI TAL-GASS

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwiavlenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 311 tal-OECD (2006). Hemm għadd ta' testijiet ta' tgharbil għall-valutazzjoni tal-biodegradabilità aerobika tas-sustanzi organiċi (Metodi ta' ttestjar C.4, C.9, C.10, u C.11 (1) u t-TG 302C tal-OECD (2)) u r-riżultati tal-applikazzjoni tagħhom intużaw b'suċċess sabiex jitbassar l-eżitu tas-sustanzi fl-ambjent aerobiku, b'mod partikolari fl-istadji aerobiċi tat-trattament tal-ilma mormi. Bosta proporzjonijiet ta' sustanzi li solubbli fl-ilma, kif ukoll ta' dawh li jassorbu mas-solidi tal-iskart, huma indirizzati b'mod aerobiku wkoll, peress li huma preżenti fi drenagġ dikantat. Madankollu, il-partijiet il-kbar ta' dawn is-sustanzi huma mqabbdin mal-hama dikantata primarja, li hija separata mid-drenagġ mhux ipproċessat f'vaski ta' dikantazzjoni qabel ma d-drenagġ dikantat, jew supernatant, jiġi ttrattat b'mod aerobiku. Imbagħad, il-hama, li fiha whud mis-sustanzi solubbli fil-likwidu interstizjali, titgħadda f'diġestituri msahhnin għat-trattament anaerobiku. Għalissa għad ma hemm ebda test f'din is-serje għall-valutazzjoni tal-biodegradabilità anaerobika f'diġestituri anaerobiċi u dan it-test għandu l-għan li jneħhi din id-diskrepanza; mhux bilfors ikun applikabbli għal kompartimenti ambjentali anossiċi oħrajn.
2. Tekniki respirometriċi li jkejlu l-ammonti ta' gass prodott, b'mod partikolari l-metan (CH_4) u d-diossidu tal-karbonju (CO_2) intużaw b'suċċess f'kundizzjonijiet anaerobiċi sabiex tiġi vvalutata l-biodegradabilità anaerobika. Birch et al (3) irrevdew dawn il-proċeduri u kkonkludew li l-hidma ta' Shelton u Tiedje (4), fuq il-bażi tal-istudji preċedenti tagħhom (5)(6)(7), kienet l-iktar waħda komprensiva. Il-metodu (4), li kompla jiġi żviluppat minn oħrajn (8) u li sar l-istandards Amerikani (9)(10), ma solviex il-problemi marbutin mas-solubilitàjiet differenti tas- CO_2 u CH_4 fil-midjum tat-test u mal-kalkolu tal-produzzjoni teorika tal-gass ta' sustanza tat-test. Ir-rapport tal-ECETOC (3) irrakkomanda l-kejl addizzjonali tal-kontenut ta' karbonju inorganiku dissolt (DIC) tal-likwidu supernatant, li għamel it-teknika ferm iktar ġeneralment applikabbli. Il-metodu tal-ECETOC kien soġġett għal eżerċizzju internazzjonali ta' kalibragġ (jew ringtest) u sar l-Istandard tal-ISO, ISO 11734 (11).
3. Dan il-metodu ta' ttestjar, li kien ibbażat fuq l-ISO 11734 (11), jiddeskrivi metodu ta' tgharbil għall-evalwazzjoni tal-biodegradabilità anaerobika potenzjali ta' sustanzi organiċi f'kundizzjoni speċifika (jiġifieri f'diġestitur anaerobiku fi żmien partikolari u medda ta' konċentrazzjoni ta' mikroorganizmi). Peress li hama dilwita tintuża b'konċentrazzjoni relattivament għolja tas-sustanza tat-test u d-durata tat-test tipikament tkun itwal mill-hin ta' żamma fid-diġestituri anaerobiċi, il-kundizzjonijiet tat-test mhux bilfors ikunu jikkorrispondu għall-kundizzjonijiet f'diġestituri anaerobiċi, u din lanqas ma hija applikabbli għall-valutazzjoni tal-biodegradabilità anaerobika tas-sustanzi organiċi f'kundizzjonijiet ambjentali differenti. Il-hama tiġi esposta għas-sustanza tat-test sa 60 jum, perjodu itwal miż-żmien normali ta' żamma tal-hama (25 sa 30 jum) f'diġestituri anaerobiċi, għad li f'żoni industrijali ż-żminijiet ta' żamma jistgħu jkunu ferm itwal. Il-previzjonijiet mir-riżultati ta' dan it-test ma jistgħux ikunu daqstantiehor konvinċenti bħal fil-każ ta' biodegradazzjoni aerobika, peress li l-evidenza migbura dwar l-imġiba tas-sustanzi tat-test f'testijiet aerobiċi "lesti" u f'testijiet ta' simulazzjoni u l-ambjent aerobiku huwa biżżejjed biex ikun hemm fiduċja li hemm rabta; f'it li xejn teżisti evidenza simili għall-ambjent anaerobiku. Huwa supponut li l-biodegradazzjoni anaerobika shiha ssehh jekk tintlahaq 75 %-80 % tal-produzzjoni teorika tal-gass. Il-proporzjonijiet għoljin tas-sustanza għall-bijomassa użata f'dawn it-testijiet ifissru li sustanza li tghaddi għandha probabilità ikbar li tiġi degradata f'diġestitur anaerobiku. Barra minn

▼ **M6**

hekk, sustanzi li ma jirnexxihomx jiġu kkonvertiti f'gass fit-test mhux bilfors jipersistu fi proporzjonijiet ta' sustanza għall-bijomassa iktar ambjentalment realiċi. Barra minn hekk, isehhu reazzjonijiet anaerobiċi oħrajn li fihom is-sustanzi jistgħu jkunu tal-inqas parzjalment degradati, eż. b'deklorinazzjoni, iżda dan it-test ma jidentifikax it-tali reazzjonijiet. Madankollu, bl-applikazzjoni tal-metodi analitiċi speċifiċi għad-determinazzjoni tas-sustanza tat-test, l-għibien tagħha tista' tiġi ssorveljata (ara l-paragrafi 6, 30, 44 u 53).

PRINĊIPJU TAT-TEST

4. Hama diġestita maħsula ⁽¹⁾, li fiha konċentrazzjonijiet baxxi (< 10 mg/l) ta' karbonju inorganiku (IC), tiġi dilwita għaxar darbiet għal konċentrazzjoni ta' solidi totali ta' 1 g/l sa 3 g/l u inkubata f'35 °C ± 2 °C f'reċipjenti ssiġillati bis-sustanza tat-test f'20 sa 100 mg C/l sa 60 jum. Jiġi pprovdut għall-kejl tal-attività tal-hama billi jsiru kontrolli inbjank paralleli b'inokulu tal-hama fil-midjum iżda mingħajr is-sustanza tat-test.
5. Titkejjel iż-żieda fil-pressjoni tal-ispazju vojt fuqani fir-reċipjenti li tirriżulta mill-produzzjoni tad-diossidu tal-karbonju u l-metan. Hafna mis-CO₂ prodott ser jiġi dissolt fil-fażi likwida jew jiġi ttrasformat f'karbonat jew karbonat tal-idroġenu fil-kundizzjonijiet tat-test. Il-karbonju inorganiku jitkejjel fi tmiem it-test.
6. L-ammont ta' karbonju (inorganiku flimkien mal-metan) li jirriżulta mill-bijodegradazzjoni tas-sustanza tat-test jiġi kkalkolat mill-produzzjoni netta ta' gass u l-formazzjoni netta ta' IC fil-fażi likwida oltre l-valuri tal-kontroll inbjank. Il-firxa tal-bijodegradazzjoni tiġi kkalkolata mill-IC totali u l-metan-C prodott bħala percentwal tal-ammont imkejjel u kkalkolat ta' karbonju miżjud bħala sustanza tat-test. Kif qed tipproċedi l-bijodegradazzjoni jista' jiġi segwit billi jittiehdu kejljet intermedji tal-produzzjoni tal-gass biss. Barra minn hekk, il-bijodegradazzjoni primarja tista' tiġi stabbilita b'analizzjiet speċifiċi fil-bidu u fi tmiem it-test.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

7. Il-karatteristiċi tal-purità, is-solubilità tal-ilma, il-volatilità u l-assorbiment tas-sustanza tat-test għandhom ikunu magħrufin sabiex tkun tista' ssir interpretazzjoni tajba tar-riżultati. Il-kontenut tal-karbonju organiku (% w/w) tas-sustanza tat-test irid ikun magħruf jew mill-istruttura kimika tiegħu jew b'kejl. Għal sustanzi tat-test volatili, kostanti tal-ligi ta' Henry imkejjel jew ikkalkolat jgħin fid-deċiżjoni ta' jekk test huwiex applikabbli. Informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għal batterji anaerobiċi hija siewja meta tingħażel konċentrazzjoni xierqa tat-test, u sabiex jiġu interpretati riżultati li juru bijodegradabilità dgħajfa. Huwa rrakkomandat li jiġi inkluz il-kontroll tal-inibizzjoni sakemm ma jkunx magħruf li s-sustanza tat-test mhijiex inibitorja għal attivitajiet mikrobjali anaerobiċi (ara l-paragrafu 21 u l-ISO 13641-1 (12)).

⁽¹⁾ Il-hama diġestita hija tahlita tal-fażijiet dikantati tad-drenaġġ u l-hama attivata, li ġew inkubati f'diġestitur anaerobiku f'madwar 35 °C sabiex jonqsu l-bijomassa u l-problemi tal-irwejjah u sabiex titjieb il-hila tal-hama li tneħhi l-ilma. Tikkonsisti f'gemgħa ta' batterji metanoġeniċi u fermentattivi anaerobiċi li jipproduċu diossidu tal-karbonju u metan (11).

▼ M6

APPLIKABILITÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

8. Dan il-metodu ta' ttestjar jista' jiġi applikat għal sustanzi li jinhallu fl-ilma; jista' jiġi applikat ukoll għal sustanzi f'it li xejn solubbli u insolubbli, diment li jintuża metodu ta' dożaġġ eżatt. eż. ara l-ISO 10634 (13). B'mod ġenerali, għal sustanzi volatili hemm bżonn ta' deċiżjoni każ, każ. Jista' jkun hemm bżonn li jittieħdu passi speċjali, pereżempju, sabiex ma jinhelix gass matul it-test.

SUSTANZI TA' REFERENZA

9. Biex tivverifika l-proċedura, tiġi ttestjata sustanza ta' referenza billi jiġu stabbiliti reċipjenti xierqa b'mod parallel bħala parti mit-testijiet normali. Fenol, benzoat tas-sodju u polietilen glikol 400 huma eżempji u jkunu mistennijin li jiġu degradati bi produzzjoni teorika ta' gass oghla minn 60 % (jiġifieri metan u karbonju inorganiku) fi żmien 60 jum (3)(14).

RIPRODUĊIBILITÀ TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

10. F'ringtest internazzjonali (14) kien hemm riproduċibilità tajba f'kejl tal-pessjoni tal-gass bejn reċipjenti ta' triplikati. Id-devjazzjoni standard relattiva (koeffiċjent ta' varjazzjoni, COV) kienet fil-parti l-kbira inqas minn 20 %, għad li dan il-valur spiss żdied għal > 20 % fil-preżenza ta' sustanzi tossiċi jew lejn tmiem il-perjodu ta' inkubazzjoni ta' 60 jum. Instabu devjazzjonijiet oghla freċipjenti b'volum ta' < 150 ml ukoll. Il-valuri finali tal-pH tal-midjums tat-test kienu fil-medda 6,5-7,0.

11. Fir-ringtest inkisbu r-riżultati li ġejjin.

Sustanza tat-test	Dejta totali n_1	Degradazzjoni medja (tad-dejta totali) (%)	Devjazzjoni Standard relattiva (tad-dejta totali) (%)	Dejta valida n_2	Degradazzjoni medja (tad-dejta totali) (%)	Devjazzjoni Standard relattiva (tad-dejta totali) (%)	Dejta > 60 % degradazzjoni f'testijiet validi n_3
Aċidu palmitiku	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilen Glikol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporzjon ta' n_2

12. Il-koeffiċjenti ta' varjazzjoni tal-medja għall-valuri kollha miksubin bl-aċidu palmitiku u l-polietilen glikol 400 telghu sa 45 % ($n = 36$) u 35 % ($n = 38$) rispettivament. Meta tnehhew il-valuri < 40 % u > 100 % (b'dawk imsemmijin l-ewwel li ġew supponuti li kienu dovuti għal kundizzjonijiet mhux ottimali, u tal-aħhar għal raġunijiet mhux magħrufin), is-COVs tnaqqsu għal 26 % u 23 %, rispettivament. Il-proporzjonijiet tal-valuri "validi" li kisbu degradazzjoni minima ta' 60 % kienu 70 % għal aċidu palmitiku u 83 % għal polietilen glikol 400. Il-proporzjonijiet tal-bijodegradazzjoni perċentwali derivata mill-kejl tad-DIC kienu relattivament baxxi iżda varjabbli. Għall-aċidu palmitiku, il-medda kienet ta' 0-35 %, il-medja 12 %, b'COV ta' 92 % u għal polietilenglikol 400 0-40 %, medja 24 %, b'COV ta' 54 %.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR

Apparat

13. Huma meħtieġa t-tagħmir tal-laboratorju tas-soltu u dawn li ġejjin:

(a) Inkubatur — li jilqa' għall-isparks u kkontrollata f'35 °C ± 2 °C;

▼ **M6**

- (b) Reċipjenti tat-test tal-ħġieġ rezistenti għall-pressjoni ta' daqs nominali xieraq⁽¹⁾, b'kull wieħed mghammar b'septum issiġillat għall-gass, li jifflaħ madwar 2 bar. Il-volum tal-ispazju vojt fuqani għandu jkun ta' madwar 10 % sa 30 % mill-volum totali. Jekk il-bijogass jinheles b'mod regolari, madwar 10 % tal-volum tal-ispazju vojt fuqani huwa xieraq, iżda jekk il-helsien tal-gass isehh biss fi tmiem it-test, 30 % huwa xieraq. Fliexken tas-serum tal-ħġieġ, b'volum nominali ta' 125 ml u volum totali ta' 160 ml, issiġillat b'septa tas-serum.⁽²⁾ u ċrieki tal-aluminju bil-pressa huma rrakkomandati meta tinheles il-pressjoni f'kull hin ta' tehid tal-kampjuni;
- (c) Apparat għall-kejl tal-pressjoni⁽³⁾ adattat sabiex ikun jista' jitkejjel u jiġi vventjat il-gass prodott, pereżempju, apparat portabbli li jkellel il-pressjoni bi preċiżjoni mqabblad ma' labra ta' siringa xierqa; valv issiġillat għall-gass tridirezżjonali jhaffef il-hlus ta' pressjoni żejda (Appendiċi 1). Hemm bżonn li l-volum intern tat-tubi u l-valv tat-transdjuser tal-pressjoni jinżamm baxx kemm jista' jkun, sabiex l-iżbalji dovuti għat-twarrib tal-volum tat-tagħmir ma jkunux sinifikanti.

Nota — Il-qari tal-pressjoni jintuża direttament sabiex jiġi kkalkolat l-ammont ta' karbonju prodott fl-ispazju vojt fuqani (paragrafi 42 sa 44). Inkella, il-qari tal-pressjoni jista' jiġi kkonvertit f'volumi (f'35 °C, pressjoni atmosferika) ta' gass prodott bl-użu ta' graff tal-konverżjoni. Dan il-graff jinbena minn dejta miksuba bl-injezzjoni ta' volumi magħrufin ta' gass tan-nitroġenu f'serje ta' reċipjenti tat-test (eż. fliexken tas-serum) f'35 °C ± 2 °C u r-reġistrazzjoni tal-qari tal-pressjoni stabbilizzata li jirriżulta (Ara l-Appendiċi 2). Il-kalkolu jintwera fin-Nota fil-paragrafu 44.

Attenzjoni — Ara li tevita korrimenti bil-labra meta tuża mikrosiringi.

- (d) Analizzatur tal-karbonju, xieraq għad-determinazzjoni diretta ta' karbonju inorganiku fil-medda ta' 1 mg/l sa 200 mg/l;
- (e) Siringi bi preċiżjoni kbira għal kampjuni gassużi u likwidi;
- (f) Segwituri u hawwada manjetiċi (mhux bilfors);
- (g) Kompartiment tal-ingwanti (rakkomandat);

Reaġenti

14. Uża reaġenti ta' grad analitiku l-hin kollu.

⁽¹⁾ Id-daqs rakkomandat huwa ta' 0,1 litru sa litru.

⁽²⁾ Huwa rakkomandat li jintużaw septa tas-silikon issiġillati għall-gass. Huwa rrakkomandat ukoll li s-siġill għall-gass tat-tappijiet, speċjalment septa tal-butyl lasktu, jiġi ttestjat għaliex hafna septa disponibbli fis-suq ma jissigillawx biżżejjed għall-gass kontra l-metan u ċerti septa ma jibqgħux issikkati meta jittaqqu b'labra fil-kundizzjonijiet tat-test.

⁽³⁾ L-apparat għandu jintuża u jiġi kkalibrat f'intervalli regolari, skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. Jekk jintuża miter tal-pressjoni tal-kwalità preskritta, eż. kkapsulat b'membrana tal-azzar, mhija meħtieġa ebda kalibrizzjoni fil-laboratorju. Il-preċiżjoni tal-kalibrizzjoni tista' tiġi vverifikata fil-laboratorju b'kejl f'punt partikolari f'1 × 10⁵ Pa b'miter tal-pressjoni b'displej mekkaniku. Meta dan il-punt jitkejjel b'mod korrett, il-linearità sejra tibqa' l-istess ukoll. Jekk jintużaw apparati oħrajn għall-kejl (mingħajr kalibraġġ iċċertifikat mill-manifattur), huwa rrakkomandat kalibraġġ fuq il-medda totali f'intervalli regolari.

▼ **M6****Ilma**

15. Ilma distillat jew dejonizzat (deossigenat bir-raxx bil-gass tan-nitroġenu li fih inqas minn 5 µl/l ossiġenu), li fih inqas minn 2 mg/l karbonju organiku dissolt (DOC).

Midjum tat-test

16. Hejji l-midjum ta' dilwizzjoni biex dan ikun fih il-kostitwenti li ġejjin bl-ammonti ddikjarati;

Anidru potassju diidroġenu fosfat (KH_2PO_4)	0,27 g
Disodju idroġenu fosfat dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12 g
Klorid tal-ammonium, (NH_4Cl)	0,53 g
Kloru tal-kalċju diidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075g
Essaidrat tal-klorur tal-manjeżju ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Tetraidrat tal-klorur tal-hadid (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g
Resazurina (indikatur tal-ossiġenu)	0,001g
Nonaidrat tas-sulfur tas-sodju ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Soluzzjoni ewlenija tal-elementi traċċa (mhux bilfors, paragrafu 18)	10 ml
Żid ilma deossigenat (paragrafu 15)	sa litru

Nota: Għandu jintuża sulfur tas-sodju fornit ġdid jew inkella għandu jinħasel u jitnixxef qabel jintuża, sabiex tiġi żgurata kapaċità ta' tnaqqis suffiċjenti. It-test jista' jsir bla ma jintuża kompartiment tal-ingwanti (ara l-paragrafu 26). F'dan il-każ, il-konċentrazzjoni finali tas-sulfur tas-sodju fil-midjum għandha tiżdied għal 0,20 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ għal kull litru. Sulfur tas-sodju jista' jiżdied ukoll minn soluzzjoni ewlenija anaerobika xierqa permezz tas-septum tar-reċipjenti tat-test magħluqin peress li din il-proċedura ser tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni. Is-sulfur tas-sodju jista' jiġi sostitwit miċ-ċitrat tat-titanju (III) li jiżdied permezz tas-septum tar-reċipjenti tat-test magħluqin peress li din il-proċedura ser tnaqqas ir-riskju ta' ossidazzjoni. Iċ-ċitrat tat-titanju (III) huwa aġent reduċenti ferm effettiv u b'tossicità baxxa, li jithejja kif ġej: Holl 2,94 g ta' diidrat taċ-ċitrat tat-trisodju f'50 ml ilma deossigenat (biex tikseb soluzzjoni ta' 200 mmol/l) użid 5 ml ta' 15 % (w/v) soluzzjoni tal-klorur tat-titanju (III) Innewtralizza għal pH $7 \pm 0,2$ b'alkali minerali u ixhet f'reċipjent xieraq taht fluss ta' nitroġenu. Il-konċentrazzjoni taċ-ċitrat tat-titanju (III) f'din is-soluzzjoni ewlenija hija ta' 164 mmol/l.

17. Hallat il-komponenti tal-midjum tat-test hlief l-aġent reduċenti (ċitrat tat-titanju tas-sulfur tas-sodju) u ixhet raxx ta' gass tan-nitroġenu fuq is-soluzzjoni għal madwar 20 min eżatt qabel l-użu sabiex tneħhi l-ossiġenu. Imbagħad żid il-volum xieraq tas-soluzzjoni mhejjija ġdida tal-aġent reduċenti (hejji filma deossigenat) eżatt qabel ma tuża l-midjum Agġusta l-pH tal-midjum, jekk ikun hemm b'żonn, b'alkali jew aċidu minerali dilwit għal $7 \pm 0,2$.

▼ **M6****Soluzzjoni ewlenija tal-elementi traċċa (mhux bilfors)**

18. Huwa rakkomandat li l-midjum tat-test għandu jkun fih l-elementi traċċa li għejjin sabiex jitjiebu l-proċessi ta' degradazzjoni anaerobika, speċjalment jekk jintużaw konċentrazzjonijiet baxxi (eż. 1g/l) ta' innokulu (11).

Manganese chloride tetrahydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Acidu boriku (H_3BO_3)	5 mg
Klorur taż-żingu (ZnCl_2)	5 mg
Klorur tar-ram (II) (CuCl_2)	3 mg
Disodium molybdate dihydrate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Essaidrat tal-klorur tal-kobalt ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Essaidrat tal-klorur tal-nikil ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Disodium selenite (Na_2SeO_3)	5 mg
Żid l-ilma deossigenat (paragrafu 15)	sa litru

Sustanza tat-test

19. Żid is-sustanza tat-test bħala soluzzjoni ewlenija, sospensjoni, emulsjoni jew direttament bħala solida jew likwida, jew assorbita ma' filtru tal-fibra tal-ħġieġ biex tikseb konċentrazzjoni ta' xejn iktar minn 100 mg/l karbonju organiku. Jekk jintużaw soluzzjonijiet ewlenin, hejji soluzzjoni xierqa bl-ilma (paragrafu 15) (deossigenata minn qabel permezz ta' raxx ta' gass tan-nitroġenu) ta' saħħa tali li l-volum miżjud ikun inqas minn 5 % tal-volum totali tat-tahlita tar-reazzjoni. Aġġusta l-pH tas-soluzzjoni ewlenija għal $\text{pH } 7 \pm 0,2$ jekk ikun hemm bżonn. Għas-sustanzi tat-test li ma jkunux solubbli bizżejjed fl-ilma, ikkonsulta l-ISO 10634 (13). Jekk jintuża solvent, hejji kontroll addizzjonali, bis-solvent biss miżjud mal-midjum inokulat. Għandhom jiġu evitati solventi organiċi li huma magħrufin li jinibixxu l-produttjoni tal-metan, bħall-kloroform u t-tetraklorur tal-karbonju.

Attenzjoni — Qandel sustanzi tat-test tossiċi u dawk bi karatteristiċi mhux magħrufin bil-galbu.

Sustanzi ta' referenza

20. Is-sustanzi ta' referenza bħall-benzoat tas-sodju, il-fenol u l-polietilen glikol 400 intużaw b'suċċess sabiex tiġi vverifikata l-proċedura, u ġew bijodegradati b'iktar minn 60 % fi żmien 60 jum. Hejji soluzzjoni ewlenija (filma deossigenat) tas-sustanza ta' referenza magħżula bl-istess mod bħas-sustanza tat-test u aġġusta għal $\text{pH } 7 \pm 0,2$ jekk ikun hemm bżonn.

Kontroll tal-inibizzjoni (kundizzjonali)

21. Sabiex tinkiseb informazzjoni dwar it-tossiċità tas-sustanza tat-test għal mikroorganizmi anaerobiċi biex issib l-iktar konċentrazzjoni tat-test xierqa, żid is-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza f'reċipjent li fih il-midjum tat-test (ara l-paragrafu 16), b'kull waħda bl-istess konċentrazzjonijiet kif miżjudin, rispettivament (ara l-paragrafi 19 u 20 u ara wkoll l-ISO 13641 — 1 (12)).

▼ M6

Hama digestita

22. Igħor il-hama digestita minn digestitur f'impjant għat-trattament tal-ilma mormi li jittratta fil-parti l-kbira drenagg domestiku. Il-hama għandha tiġi kkaratterizzata bis-shih u l-informazzjoni ta' sfond dwarha għandha tiġi rrapportata (ara l-paragrafu 54). Jekk huwa maħsub li ser isir użu mill-inokulu adattat, tista' tiġi kkunsidrata hama digestita minn impjant tat-trattament tad-drenagg industrijali. Uża fliexken b'għonq wiesa' mibnjin minn polietilen b'densità għolja jew materjal simili, li jista' jespandi, għall-gbir tal-hama digestita. Żid il-hama sa madwar 1cm mill-quċcata tal-fliexken u ssiġillahom sew, idealment b'valv tas-sikurezza. Wara li tittrasportaha fil-laboratorju, il-hama miġbura tista' tituża direttament jew titqiegħed f'digestitur ta' skala tal-laboratorju. Ehles il-bijogass zejjed billi tiftaħ il-fliexken tal-hama bil-galbu. Inkella, tista' tintuża hama anaerobika mkabbra fil-laboratorju bħala sors ta' inokulu iżda jista' jkun li l-ispettru ta' attività tagħha għie indebolit.

Attenzjoni — Il-hama digestita tipproduċi gassijiet li jaqbd u li jipprezentaw riskji ta' nirien u splużjoni: potenzjalment fiha wkoll organiżmi patogeniċi, u għalhekk għandek tiegħu l-prekawżjonijiet xierqa meta tqandel il-hama. Għal raġunijiet ta' sikurezza, tużax reċipjenti tal-ħgiegħ biex tiġbor il-hama.

23. Sabiex tonqos il-produzzjoni tal-gass ta' sfond u tonqos l-influwenza tal-kontrolli inbjank, tista' tiġi kkunsidrata predigestjoni tal-hama. Jekk ikun hemm bżonn ta' predigestjoni, il-hama għandha tithalla tiddigesti mingħajr ma jizdied ebda nutrijent jew substraat f'35 °C ± 2 °C għal mhux iktar minn 7 ijiem. Instab li l-predigestjoni għal madwar 5 ijiem normalment tipprovdi tnaqqis ottimali fil-produzzjoni tal-gass tal-inbjank mingħajr zidiet mhux aċċettabbli fil-perjodi ta' dewmien jew ta' inkubazzjoni matul il-fażi tat-test jew telf ta' attività f'numru żgħir tas-sustanzi ttestjati.

24. Għas-sustanzi tat-test li f'it li xejn huma bijodegradabbli, jew li huma mistennjin li jkun hekk, ikkunsidra l-preespozizzjoni tal-hama għas-sustanza tat-test biex tikseb inokulu iktar adattat. F'każ bħal dan, żid is-sustanza tat-test f'konċentrazzjoni tal-karbonju organiku ta' 5 mg/l għal 20 mg/l mal-hama digestita u inkubata sa massimu ta' gimgħatejn. Aħsel il-hama preesposta bil-galbu qabel tużaha (ara l-paragrafu 25) u indika fir-rapport tat-test il-kundizzjonijiet tal-preespozizzjoni.

Inokulu

25. Aħsel il-hama (ara l-paragrafi 22 sa 24) eżatt qabel tużaha, biex tnaqqas il-konċentrazzjoni tal-IC għal inqas minn 10 mg/l fis-sospensjoni tat-test finali. Iċċentrifuga l-hama f'tubi ssiġillati (eż. 3 000 g matul 5 min) u armi s-supernatant. Issospendi l-pelit li jirrizulta f'midjum deossigenat (paragrafi 16 u 17), erga' ċċentrifuga s-sospensjoni u armi l-likwidu supernatanti. Jekk l-IC ma naqsitx bizzejjed, il-proċedura ta' hasil tal-hama tista' tiġi ripetuta għal massimu ta' darbtejn. Dan ma jidherx li jaffettwa l-mikroorganizmi b'mod avvers. Fl-aħħar nett, issospendi l-pelit fil-volum meħtieġ tal-midjum tat-test u stabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-solidi totali [eż. ISO 11923 (15)]. Il-konċentrazzjoni finali tas-solidi totali fir-reċipjenti tat-test għandha tkun fil-medda ta' 1 g/l sa 3 g/l (jew madwar 10 % ta' dik fil-hama digestita mhux dilwita). Aghmel l-operazzjonijiet ta' hawn fuq b'tali mod li l-hama f'it li xejn tidhol f'kontatt mal-ossigenu (eż. uża atmosfera tan-nitroġenu).

▼ M6

PROCEDURA TAT-TEST

26. Aghmel il-proċeduri inizjali li ġejjin billi tuża tekniki biex iżżomm il-kuntatt bejn il-hama diġestita u l-ossigenu baxx kemm jista' jkun, pereżempju, jista' jkun hemm bżonn li jsir xogħol ġewwa kompartiment tal-ingwanti f'atmosfera ta' nitroġenu u/jew tagħmel porga tal-fliexken bin-nitroġenu (4).

Thejjija tal-assaġġi tat-test u tal-kontroll

27. Hejji tal-inqas reċipjenti tat-test triplikati (ara l-paragrafu 13-b) għas-sustanza tat-test, kontrolli inbjank, sustanza ta' referenza, kontrolli ta' inibizzjoni (kundizzjonali) u kompartimenti ta' kontroll tal-pressjoni (proċedura mhux obligatorja) (ara l-paragrafi 7, 19 sa 21). Jistgħu jithejjew ukoll reċipjenti addizzjonali sabiex tiġi evalwata l-bijodegradazzjoni primarja bl-użu ta' analiżijiet speċifiċi għas-sustanza tat-test. L-istess sett ta' kontrolli inbjank jista' jintuża għal bosta sustanzi tat-test fl-istess test diment li l-volumi tal-ispazju vojt fuqani jkunu konsistenti.
28. Hejji l-inokulu dilwit qabel ma żżidu fir-reċipjenti eż. permezz ta' pipetta b'toqba wiesgħa. Żid l-alikwoti ta' inokulu mhawwad sew (paragrafu 25) sabiex il-konċentrazzjoni tas-solidi totali tkun l-istess fir-reċipjenti kollha (bejn 1 g/l u 3 g/l). Żid is-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza tat-test u ta' referenza wara li tagħgustahom għal $\text{pH } 7 \pm 0,2$, jekk ikun hemm bżonn. Is-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza għandhom jiżdiedu bl-użu tal-iktart rotta tal-aministrazzjoni xierqa (paragrafu 19).
29. Is-soltu, il-konċentrazzjoni tat-test tal-karbonju organiku għandha tkun bejn 20 u 100 mg/l (paragrafu 4). Jekk is-sustanza tat-test tkun tossika, il-konċentrazzjoni tat-test għandha titnaqqas għal 20 mg C/l, jew saħansitra inqas jekk trid titkejjel biss il-bijodegradazzjoni primarja b'analizijiet speċifiċi. Ta' min jinnota li l-varjabbiltà tar-riżultati tat-test tiżdied f'konċentrazzjonijiet inqas tat-test.
30. Għal reċipjenti inbjank, żid ammont ekwivalenti tat-trasportatur użat biex tiddoża s-sustanza tat-test minflok soluzzjoni ewlenija, sospensjoni jew emulsjoni. Jekk is-sustanza tat-test ingħatat bl-użu ta' filtri tal-fibra tal-gass jew solventi organiċi, żid mal-inbjanki filtru jew solvent b'volum ekwivalenti li ġie evaporat. Hejji rreplikat żejjed b'sustanza tat-test għall-kejl tal-valur tal-pH. Aġġusta l-pH għal $7 \pm 0,2$, jekk ikun hemm bżonn, b'ammonti żgħir ta' alkali jew aċidu minerali dilwit. L-istess ammonti ta' aġenti newtralizzanti għandhom jiżdiedu fir-reċipjenti kollha tat-test. Dawn iż-żidiet ma għandhomx ikunu saru peress li l-valur tal-pH tas-soluzzjonijiet ewlenin tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza diġà jkun aġġustat (ara l-paragrafi 19 u 20). Sabiex titkejjel il-bijodegradazzjoni primarja, għandu jittiehed kampjun xieraq mir-reċipjent ta' kontroll tal-pH, jew minn reċipjent tat-test addizzjonali, u l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test għandha titkejjel bl-użu ta' analiżijiet speċifiċi. Fir-reċipjenti kollha jistgħu jiżdiedu kalamiti mgħot-tijn jekk iridu jithawdu t-tahlitiet ta' reazzjoni (mhux bilfors).
31. Ara li l-volum totali tal-likwidu V_1 u l-volum tal-ispazju vojt fuqani V_h huma l-istess fir-reċipjenti kollha; hu nota u rreġistra l-valuri ta' V_1 u V_h . Kull reċipjent għandu jiġi ssiġillat b'septum tal-gass u jiġi ttrasferit mill-kompartiment tal-ingwanti (ara l-paragrafu 26) fl-inkubatur (ara l-paragrafu 13-a).

▼ M6

Sustanzi tat-test insolubbli

32. Żid l-ammonti mwieżna tas-sustanzi, li f'it li xejn huma solubbli fl-ilma, direttament fir-reċipjenti mhejjin. Meta jkun hemm bżonn li jsir użu minn solvent (ara l-paragrafu 19) ittrasferixxi s-soluzzjoni tas-sustanza tat-test jew is-sospensjoni fir-reċipjenti vojta. Meta dan ikun possibbli, evapora s-solvent billi tgħaddi gass tan-nitroġenu mir-reċipjenti u mbagħad żid l-ingredjenti l-oħrajn, jiġifeiri l-hama dilwita (paragrafu 25) u l-ilma deossigenat kif mehtiegħ. Għandu jithejja kontroll bis-solvent addizzjonali (ara l-paragrafu 19). Għal metodi oħrajn ta' kif jiżdiedu sustanzi insolubbli, jista' jiġi kkon-sultat l-ISO 10634 (13). Is-sustanzi tat-test likwidi jistgħu jiġu dożati b'si-ringa fir-reċipjenti ssiġillati kompletament ippreparati, jekk ikun mistenni li l-pH inizjali mhijiex ser taqbeż 7 ± 1 , inkella doża kif spjegat iktar 'il fuq (ara l-paragrafu 19).

Inkubazzjoni u kejl tal-pressjoni tal-gass

33. Inkuba r-reċipjenti mhejjin f' $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ għal madwar siegħa biex ikunu jistgħu jekwilibraw u ehles il-gass żejjed fl-atmosfera, pereżempju, billi theżżeż kull reċipjent għalih, billi ddahħal il-labra tal-apparat li jkejjel il-pressjoni (paragrafu 13-c) mis-siġill u tiftah il-valv sakemm l-apparat li jkejjel il-pressjoni jaqra zero. Jekk f'dan l-istadju, jew meta jsiru kejljet intermedji, il-pressjoni tal-ispazju vojta fuqani tkun inqas minn dik atmosferika, għandu jiddahħal gass tan-nitroġenu sabiex terġa' tiġi stabbilita l-pressjoni atmosferika. Aghlaq il-valv (ara l-paragrafu 13-c) u kompli inkuba fid-dlam, billi tiżgura li l-partijiet kollha tar-reċipjenti jinżammu fit-temperatura ta' diġestjoni. Zomm ir-reċipjenti taht osservazzjoni wara l-inkubazzjoni għal 24 sa 48 siegħa. Irrifjuta r-reċipjenti jekk il-kontenuti tar-reċipjenti juru tilwin roża distint fil-likwidu supernatanti, jiġifieri jekk ir-Resazurina (ara l-paragrafu 16) tkun bidliet il-kulur, peress li dan jindika l-preżenza ta' ossiġenu (ara l-paragrafu 50). Filwaqt li s-sistema tista' tittollera ammonti żgħir ta' ossiġenu, konċentrazzjonijiet oghla jistgħu jxekklu serjament il-bijodegradazzjoni anaerobika. Ir-rifjut ta' reċipjent wiehed kultant minn sett ta' triplikati jista' jiġi aċċettat, izda l-incidenza ta' hafna iktar rifjuti trid iġġib magħha investigazzjoni fil-proċeduri sperimentali kif ukoll ir-ripetizzjoni tat-test.

34. Hallat il-kontenuti ta' kull reċipjent bil-galbu billi thawwadhom u theżżizhom għal f'it minuti tal-inqas darbtejn jew tlieta fil-ġimgħa u f'it qabel kull kejl tal-pressjoni. It-theżżiz jerga' jissospendi l-inokulu u jiżgura ekwilibriju gassuż. Il-kejljet tal-pressjoni kollha għandhom jittiehdu malajr, peress li r-reċipjenti tat-test jistgħu jkunu soġġetti għal tnaqqis tat-temperatura, li jwassal għal qari hażin. Matul il-kejl, il-pressjoni tar-reċipjent tat-test kollu, inkluż l-ispazju vojta fuqani, għandu jinżamm fit-temperatura ta' diġestjoni. Kejjel il-pressjoni tal-gass, pereżempju, billi ddahħal mis-septum il-labra tas-siringa (paragrafu 13-c) imqabbda mal-apparat li jissorvelja l-pressjoni. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat milli jidhol l-ilma fil-labra tas-siringa; jekk dan isehh, il-partijiet imxarrbin għandhom jiġu xxottati u titwahħal labra ġdida. Il-pressjoni għandha titkejjel f'millibars (ara l-paragrafu 42). Il-pressjoni tal-gass fir-reċipjenti tista' titkejjel kull ċertu żmien, eż. darba fil-ġimgħa, u l-gass żejjed jista' jinheles fl-atmosfera, izda dan mhuwiex obligatorju. Inkella, il-pressjoni titkejjel biss fi tmiem it-test sabiex jiġi stabbilit l-ammont ta' bijogass prodott.

35. Huwa rrakkomandat li jsir il-qari intermedju tal-pressjoni tal-gass, peress li zieda fil-pressjoni tipprovdi gwida dwar meta jista' jiġi tterminat it-test u tippermetti li tiġi segwita l-kinetika (ara l-paragrafu 6).

▼ M6

36. Normalment, għandek ittemm it-test wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' 60 jum sakemm il-kurva ta' bijodegradazzjoni miksuba mill-kejl tal-pressjoni ma tkunx laqhet il-fażi plateau qabel dak iż-żmien; dik hija l-fażi li fiha tkun intlaqet id-degradazzjoni massima u l-kurva ta' bijodegradazzjoni tibqa' f'livell kostanti. Jekk il-valur tal-plateau jkun inqas minn 60 %, l-interpretazzjoni tkun diffiċli għaliex dan jindika li parti biss mill-molekola giet mineralizzata jew li seħħ żball. Jekk fi tmiem il-perjodu normali ta' inkubazzjoni jkun qed jiġi prodott gass iżda jkun ċar li ma ntlahqitx fażi plateau, f'dak il-kaz għandu jiġi kkunsidrat jekk jittawwalx it-test sabiex jiġi vverifikat jekk huwiex ser jintlaħaq il-plateau (> 60 %).

Kejl tal-karbonju inorganiku

37. Fi tmiem it-test wara l-aħħar kejl tal-pressjoni tal-gass, halli l-hama toqghod. Iftah kull reċipjent għalih u mill-ewwel għandek tiehu kampjun biex issib il-konċentrazzjoni (mg/l) tal-karbonju inorganiku (IC) fil-likur supernatanti. La għandha tiġi applikata ċentrifugazzjoni u lanqas filtrazzjoni għal-likur supernatanti, peress li jkun hemm telf inaċċettabbli ta' diossidu tal-karbonju dissolt. Jekk il-likur ma jkunx jista' jiġi analizzat malli jittiehed il-kampjun, aħznu f'kunjett issigillat, mingħajr spazju vojta fuqani u mkessah għal madwar 4 °C għal massimu ta' jumejn. Wara l-kejl tal-IC, kejjel u rreġistra l-valur tal-pH.

38. Inkella, l-IC fis-supernatant jista' jiġi stabbilit indirettament bil-hlus tal-IC dissolt bħala diossidu tal-karbonju li jista' jitkejjel fl-ispazju vojta fuqani. Wara l-aħħar kejl tal-pressjoni tal-gass, aġġusta l-pressjoni f'kull wiehed mir-reċipjenti tat-test għall-pressjoni atmosferika. Aċidifika l-kontenut ta' kull reċipjent għal madwar pH 1 billi żżid l-aċidu minerali kkonċentrat (eż. H₂SO₄) permezz tas-septum tar-reċipjenti ssigillati. Inkuba r-reċipjenti mheżzin f'35 °C ± 2 °C għal madwar 24 siegħa u kejjel il-pressjoni tal-gass li tirriżulta mid-diossidu tal-karbonju evolut billi tuża l-apparat li jkejjel il-pressjoni.

39. Aghmel qari simili għas-sustanza inbjank ta' referenza korrispondenti u, jekk inkluzi, ir-reċipjenti tal-kontroll ta' inibizzjoni (ara l-paragrafu 21).

40. F'ċerti kazijiet, speċjalment jekk jintużaw l-istess reċipjenti tal-kontroll għal bosta sustanzi tat-test, il-kejl tal-konċentrazzjonijiet intermedji tal-IC fir-reċipjenti tat-test u tal-kontroll għandhom jiġu kkunsidrati, kif ikun xieraq. F'dan il-kaz, għandu jithejja numru suffiċjenti ta' reċipjenti għall-kejl intermedji kollha. Dan il-proċediment huwa ppreferut milli meta jittiehdu l-kampjuni kollha minn reċipjent wiehed biss. Dan tal-aħħar jista' jsir biss jekk il-volum meħtieġ għall-analizi tad-DIC ma jitqiesx li jkun għoli wisq. Il-kejl tad-DIC għandu jsir wara li titkejjel il-pressjoni tal-gass mingħajr ma jinheles il-gass eċċessiv kif deskritt hawn taht:

— hu l-iżgħar volum possibbli ta' kampjuni ta' supernatant b'siringa mis-septum bla ma tiftah ir-reċipjenti sabiex jiġi stabbilit l-IC fil-kampjun;

— wara li tiehu l-kampjun jinheles jew ma jinhelisx il-gass eċċessiv;

— għandu jitqies li anki tnaqqis żgħir fil-volum tas-supernatant (eż. madwar 1 %) jista' jikkaguna żieda sinifikanti fil-volum tal-gass tal-ispazju vojta fuqani (V_h);

— l-ekwazzjonijiet (ara l-paragrafu 44) huma kkoreġuti billi jiżdied V_h fl-ekwazzjoni 3, skont kif ikun meħtieġ.

▼ M6**Analizijiet speċifiċi**

41. Jekk trid tiġi stabbilita degradazzjoni anaerobika primarja (ara l-paragrafu 30), hu volum xieraq tal-kampjun għal analizijiet speċifiċi fil-bidu u fi tmiem it-test mir-reċipjenti li fihom is-sustanza tat-test. Jekk isir hekk, kun af li l-volum tal-ispazju vojta fuqani (V_h) u tal-likwidu (V_l) ser jinbidlu u dan għandek tikkunsidrah meta tikkalkola r-riżultati tal-produzzjoni tal-gass. Inkella, jistgħu jittiehdu kampjuni għal analizijiet speċifiċi mit-tahlitiet addizzjonali li qabel ġew stabbiliti għal dan il-ghan (paragrafu 30).

DEJTA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

42. Għal raġunijiet prattiċi, il-pressjoni tal-gass titkejjel f'millibars ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ hPa} = 102 \text{ Pa}$; $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), il-volum f'litri u t-temperatura fi gradi Celsius.

Karbonju fl-ispazju vojta fuqani

43. Peress li 1 mol tal-metan u 1 mol tad-diossidu tal-karbonju fihom 12-il g karbonju, il-massa tal-karbonju f'volum partikolari ta' gass evolut tista' tingħata bħala:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ekwazzjoni [1]}$$

fejn:

m = il-massa ta' karbonju (mg) f'volum partikolari ta' gass evolut;

12 = il-massa atomika relattiva ta' karbonju;

n = in-numru ta' moli ta' gass fil-volum partikolari.

Jekk gass li mhuwiex metan jew diossidu tal-karbonju (eż. N_2O) jiġi ġġenerat f'ammonti konsiderevoli, il-formula [1] għandha tiġi emendata sabiex tiġi deskritta l-possibbiltà ta' effetti mill-gassijiet iġġenerati.

44. Mil-liġijiet tal-gass n jista' jingħata bħala:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ekwazzjoni [2]}$$

fejn:

p = il-pressjoni tal-gass (Pascals);

V = il-volum tal-gass (m^3);

R = il-kostanti tal-gass molari [$8,314 \text{ J}/(\text{mol K})$];

T = it-temperatura ta' inkubazzjoni (Kelvins).

Bit-tagħqid tal-ekwazzjonijiet [1] u [2] u r-razzjonalizzazzjoni sabiex tkun tista' ssir produzzjoni tal-kontroll inbjank tal-gass:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ekwazzjoni [3]}$$

fejn:

m_h = il-massa tal-karbonju nett prodotta bħala gass fl-ispazju vojta fuqani (mg);

Δp = il-medja tad-differenza bejn il-pressjonijiet inizjali u finali fir-reċipjenti tat-test neqes il-medja korrispondenti fir-reċipjenti inbjank (millibars);

▼ **M6**

V_h = il-volum tal-ispazju vojta fuqani fir-riċipjent (l);

0,1 = il-konverżjoni kemm minn newtons/m² għal millibars kif ukoll minn m³ għal litri.

L-ekwazzjoni [4] għandha tintuża għat-temperatura normali ta' inkubazzjoni ta' 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Ekwazzjoni [4]}$$

Nota: Kalkolu tal-volum alternattiv. Il-qari tal-apparat li jkejjel il-pressjoni jiġi kkonvertit f'ml ta' gass prodott bl-użu tal-kurva standard iġġenerata permezz tal-plot tal-volum (ml) injettat kontra l-qari tal-apparat li jkejjel (Appendiċi 2). In-numru ta' moli (n) ta' gass fl-ispazju vojta fuqani ta' kull riċipjent huwa kkalkolat billi tiġi diviża l-produzzjoni ta' gass kumulattiva (ml) b'25 286 ml/mol, li huwa l-volum okkupa minn mol wieħed ta' gass f'35 °C u pressjoni atmosferika standard. Peress li mol 1 ta' CH₄ u mol 1 ta' CO₂ fihom 12 g karbonju, l-ammont ta' karbonju (mg) fl-ispazju vojta fuqani (m_h) jinkiseb bl-ekwazzjoni [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ekwazzjoni [5]}$$

Razzjonalizzazzjoni li tipprovi għall-produzzjoni tal-kontroll inbjank tal-gass:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475 \Delta V \quad \text{Ekwazzjoni [6]}$$

fejn:

m_h = il-massa tal-karbonju nett prodotta bħala gass fl-ispazju vojta fuqani (mg);

ΔV = il-medja tad-differenza bejn il-volum ta' gass prodott fl-ispazju vojta fuqani fir-riċipjenti tat-test u r-riċipjenti tal-kontroll inbjank;

25286 = il-volum okkupa minn gass tal-mol 1 35 °C, atmosfera 1.

45. Kif mexiet il-bijodegradazzjoni jista' jiġi segwit billi tiġi pplotjata ż-żieda kumulata tal-pressjoni Dp (millibars) kontra ż-żmien, jekk xieraq. Minn din il-kurva, identifika u rreġistra l-fażi ta' dewmien (jiem). Il-fażi ta' dewmien hija ż-żmien mill-bidu tat-test sakemm tibda degradazzjoni sinifikanti (pereżempju ara l-Appendiċi 3). Jekk il-kampjuni intermedji tas-supernatant ittiedu u ġew analizzati (ara l-paragrafi 40, 46 u 47), f'dak il-każ jista' jiġi pplotjat is-C totali prodott (f'gass flimkien ma' dak f'likwidu) minflok il-pressjoni kumulattiva biss.

Karbonju fil-likwidu

46. L-ammont ta' metan fil-likwidu huwa injorat peress li huwa magħruf li s-solubilità tiegħu fl-ilma hija baxxa hafna. Ikkalkola l-massa ta' karbonju organiku fil-likwidu tar-riċipjenti tat-test billi tuża l-ekwazzjoni [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Ekwazzjoni [7]}$$

fejn:

m_l = il-massa ta' karbonju inorganiku fil-likwidu (mg);

C_{net} = il-koncentrazzjoni ta' karbonju inorganiku fir-riċipjenti tat-test neqes dik fir-riċipjenti tal-kontroll f' tmiem it-test (mg/l);

V_l = il-volum ta' likwidu fir-riċipjenti tat-test (l).

▼ M6**Karbonju gassifikat totali**

47. Ikkalkola l-massa totali ta' karbonju gassifikat fir-reċipjent bl-użu tal-ekwazzjoni [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Ekwazzjoni [8]}$$

fejn:

m_t = il-massa totali ta' karbonju gassifikat (mg);

m_h u m_l huma kif iddefiniti iktar 'il fuq.

Karbonju tas-sustanza tat-test

48. Ikkalkola l-massa ta' karbonju fir-reċipjenti tat-test derivata mis-sustanza tat-test miżjuda bl-użu tal-ekwazzjoni [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Ekwazzjoni [9]}$$

fejn:

m_v = il-massa ta' karbonju tas-sustanza tat-test (mg);

C_c = il-konċentrazzjoni tal-karbonju tas-sustanza tat-test fir-reċipjent tat-test (mg/l)

V_l = il-volum ta' likwidu fir-reċipjenti tat-test (l).

Firxa tal-bijodegradazzjoni

49. Ikkalkola l-bijodegradazzjoni perċentwali mill-gass tal-ispazju vojt fuqani billi tuża l-ekwazzjoni [10] u l-bijodegradazzjoni perċentwali totali billi tuża l-ekwazzjoni [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Ekwazzjoni [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Ekwazzjoni [11]}$$

fejn:

D_h = il-bijodegradazzjoni mill-gass tal-ispazju vojt fuqani (%);

D_t = il-bijodegradazzjoni totali (%);

m_h , m_v u m_t huma kif iddefiniti iktar 'il fuq.

Il-grad ta' bijodegradazzjoni primarja huwa kkalkolat mill-kejliet (mhux obbligatorji) tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fi tmiem l-inkubazzjoni, bl-użu tal-ekwazzjoni [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad \text{Ekwazzjoni [12]}$$

fejn:

D_p = id-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test (%);

S_i = il-konċentrazzjoni inizjali tas-sustanza tat-test (mg/l);

S_e = il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fi tmiem (mg/l).

Jekk il-metodu ta' analiżi jindika konċentrazzjonijiet sinifikanti tas-sustanza tat-test fl-inokulu tal-hama anaerobika mhux emendat, uża l-ekwazzjoni [13]:

▼ **M6**

$$D_p^I = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Ekwazzjoni [13]}$$

fejn:

D_p^I = id-degradazzjoni primarja tas-sustanza tat-test (%);

S_{ib} = il-konċentrazzjoni inizjali “apparenti” tas-sustanza tat-test fil-kontrolli inbjank (mg/l);

S_{eb} = il-konċentrazzjoni “apparenti” tas-sustanza tat-test fil-kontrolli inbjank fi tmiem (mg/l).

Validità tar-riżultati

50. Il-qari tal-pressjoni għandu jintuża biss minn reċipjenti li ma jurux tilwin roża (ara l-paragrafu 33). Il-kontaminazzjoni bl-ossigenu tiġi minimizzata bl-użu ta' tekniki xierqa ta' tqandil anaerobiku.
51. Għandu jiġi kkunsidrat li t-test huwa validu jekk is-sustanza ta' referenza tilhaq plateau li tirrappreżenta bijodegradazzjoni ta' iktar minn 60 % ⁽¹⁾.
52. Jekk il-pH fi tmiem it-test tkun qabżet il-medda ta' 7 ± 1 u tkun seħħet bijodegradazzjoni insuffiċjenti, irrepeti t-test b'kapaċità ikbar ta' bafer tal-midjum.

Inibizzjoni tad-degradazzjoni

53. Il-produzzjoni tal-gass f'reċipjenti li fihom kemm is-sustanza tat-test kif ukoll dik ta' referenza għandha tkun tal-inqas daqs dik fir-reċipjenti li fihom biss sustanza ta' referenza; inkella tiġi indikata l-inibizzjoni tal-produzzjoni tal-gass. F'ċerti każijiet, il-produzzjoni tal-gass f'reċipjenti li fihom is-sustanza tat-test mingħajr is-sustanza ta' referenza tkun inqas minn dik fil-kontrolli inbjank, u dan jindika li s-sustanza tat-test hija inibitorja.

Rapport tat-test

54. Ir-rapport tat-test irid jinkludi l-informazzjoni li ġejja:

Sustanza tat-test:

- l-isem komuni, isem is-sustanza kimika, in-numru tas-CAS, il-formula strutturali u l-karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti;
- il-purità (impuritajiet) tas-sustanza tat-test.

Kundizzjonijiet tat-test:

- il-volumi ta' likur diġestitur dilwit (V_I) u tal-ispazju vojta fuqani (V_h) fir-reċipjent;
- deskrizzjoni tar-reċipjenti tat-test, il-karatteristiċi ewlenin tal-kejl tal-bijogass (eż. it-tip ta' apparat li jkejjel il-pressjoni) u tal-analizzatur tal-IC;
- l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza għas-sistema tat-test: il-konċentrazzjoni tat-test użata u kwalunkwe użu ta' solventi;
- dettalji dwar l-inokulu użat: l-isem tal-impjant ta' trattament tad-drenaġġ, deskrizzjoni tas-sors tal-ilma mormi ttrattat (eż. it-temperatura operazzjonali, il-hin ta' żamma tal-ħama, predominanza domestika, eċċ.), il-konċentrazzjoni, kwalunkwe informazzjoni meħtieġa biex tiġi sostanzjata u informazzjoni dwar kwalunkwe prettrattament tal-inokulu (eż. prediġestjoni, preespożizzjoni);
- it-temperatura ta' inkubazzjoni;
- in-numru ta' rreplikati.

⁽¹⁾ Dan għandu jerga' jiġi evalwat jekk ikunu inkluzi sustanzi kimiċi ta' referenza assorbenti u insolubbli.

▼ **M6***Riżultati:*

- il-pH u l-valuri tal-IC fi tmiem it-test;
- il-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-bidu u fi tmiem it-test, jekk ikun sar kejl speċifiku.
- id-dejta kollha mkejla miġbura fis-sustanza tat-test, inbjank u ta' referenza u r-reċipjenti tal-kontroll ta' inibizzjoni, kif xieraq (eż. il-pessjoni f'millibars, il-konċentrazzjoni ta' karbonju inorganiku (mg/l)) f'forma tabulari (dejta mkejla għall-ispazju vojt fuqani u l-likwidu għandha tiġi rrapportata b'mod separat);
- it-trattament statistiku tad-dejta, id-durata tat-test u dijagramma tal-bijodegradazzjoni tas-sustanza tat-test, is-sustanza ta' referenza u l-kontroll tal-inibizzjoni;
- il-bijodegradazzjoni percentwali tas-sustanza tat-test u s-sustanza ta' referenza;
- ir-raġunijiet għal kwalunkwe rifjut tar-riżultati tat-test;
- diskussjoni tar-riżultati.

LETTERATURA

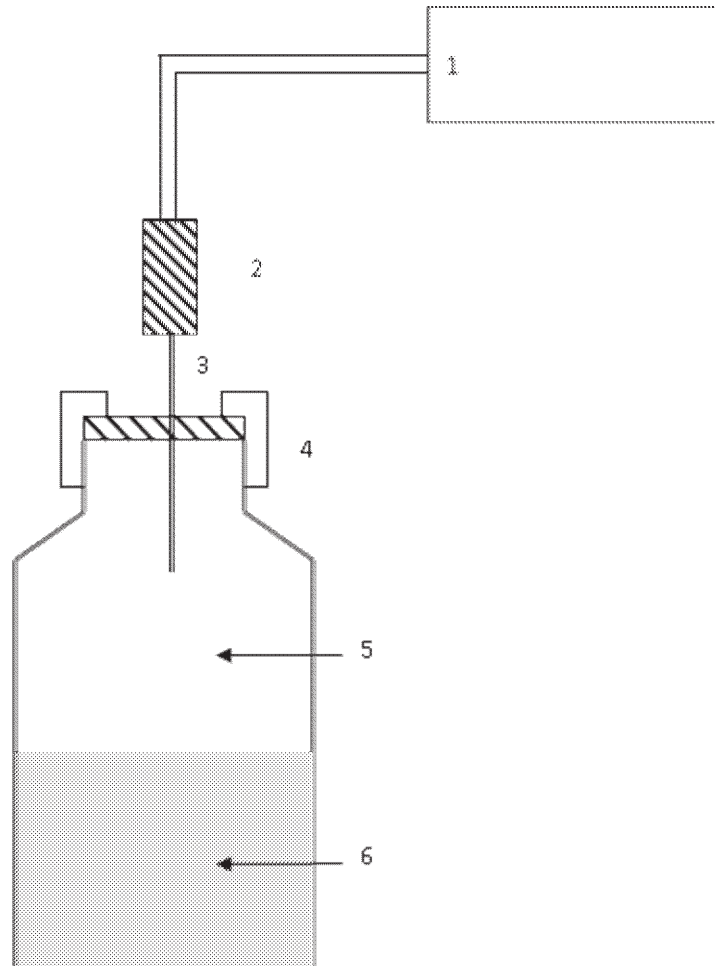
- (1) Il-kapitoli li ġejjin ta' dan l-Anness:
 - C.4, Determinazzjoni tal-Bijodegradabilità Lesta;
 - C.9, Bijodegradazzjoni — Test ta' Zahn-Wellens;
 - C.10, Test ta' Simulazzjoni — Trattament tad-Drenaġġ Aerobiku:
 - A: Unitajiet tal-Hama Attivata, B: Bijofilms
 - C.11, Bijodegradazzjoni — Inibizzjoni tar-respirazzjoni tal-hama attivata
- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris
- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* **19**, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
- (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, **47**, 850-857.
- (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* **13**, 485-492.
- (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 84-89.
- (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, **17**, 2441-2460.
- (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼ M6

- (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
- (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.
- (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.
- (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 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.
- (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
- (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼ **M6***Appendiċi 1*

Eżempju ta' apparat li jkejjel il-produzzjoni tal-bijogass bil-pressjoni tal-gass



Leggenda:

- 1 — Apparat li jkejjel il-pressjoni
- 2 — Valv issigillat għall-gass tridirezjonali
- 3 — Labra tas-siringa
- 4 — Siġill impermeabbli għall-gass (għatu kkrimpjat u septum)
- 5 — Spazju fil-wiċċ (V_h)
- 6 — Inokulu ta' hama digerita (V_l)

Reċipjenti tat-test f'ambjent ta' $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

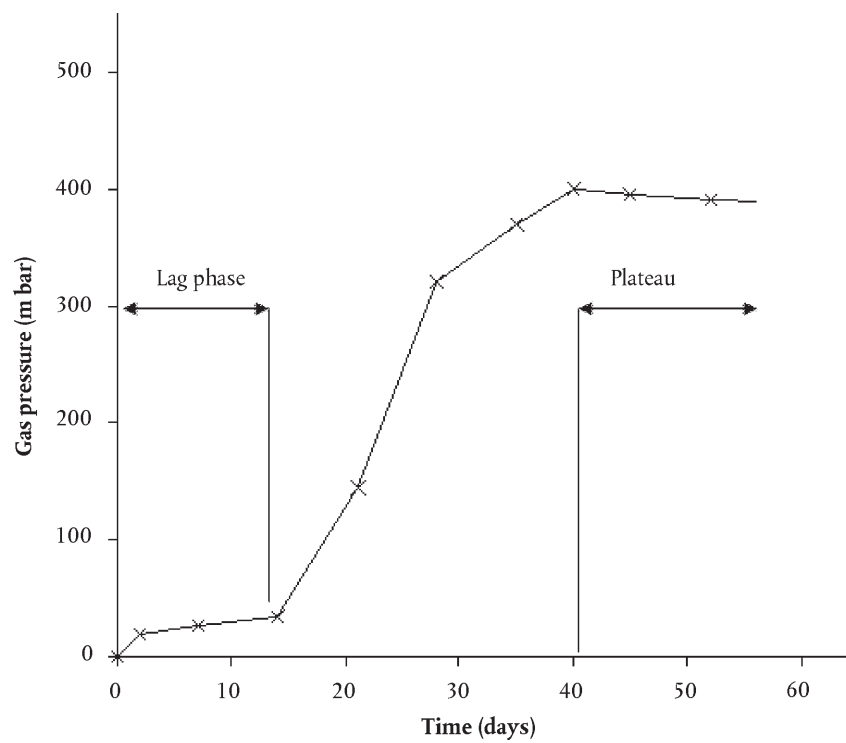
▼ **M6***Appendiċi 2***Konverżjoni tal-apparat li jkejjel il-pressjoni**

Il-qari tal-apparat li jkejjel il-pressjoni jista' jkun marbut mal-volumi tal-gass peremzz ta' kurva standard prodotta bl-injezzjoni ta' volumi magħrufin ta' arja ta' $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ fil-fliexken tas-serum li fihom volum ta' ilma daqs dak tat-tahlita tar-reazzjoni, V_R :

- Ferra' V_R ml alikwoti ta' ilma, miżmuma f' $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ f'ħames fliexken tas-serum. Issigilla l-ilmijiet u qiegħedhom siegħa f'banjumarija 35 °C sabiex jekwilibraw;
- Ixgħel il-miter tal-pressjoni, hallih jistabbilizza, u aġġusta għal zero;
- Dahħal il-labra tas-siringa minn ġos-sigill ta' wiehed mill-fliexken, iftaħ il-valv sakemm l-apparat li jkejjel il-pressjoni jaqra zero u aghlaq il-valv;
- Irrepeti l-proċedura bil-bqija tal-fliexken;
- Injetta 1 ml arja f' $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ f'kull fliexkun. Dahħal il-labra (fuq il-miter) mis-sigill ta' wiehed mill-fliexken u halli l-qari tal-pressjoni jistabbilizza. Irreġistra l-pressjoni, iftaħ il-valv sakemm il-pressjoni tinqara zero u mbagħad aghlaq il-valv;
- Irrepeti l-proċedura għall-fliexken li jfidal;
- Irrepeti l-proċedura shiha ta' hawn fuq billi tuża 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml u 50 ml arja;
- Ipplottja kurva tal-konverżjoni tal-pressjoni (Pa) kontra l-volum ta' gass injettat V_b (ml). Ir-rispons tal-istrument huwa lineari tul il-medda bejn 0 Pa sa 70 000 Pa, u 0 ml sa 50 ml tal-produzzjoni tal-gass.

▼ **M6***Appendiċi 3*

Eżempju ta' kurva ta' degradazzjoni (żieda fil-pressjoni netta kumulattiva)



Eżempju ta' skedi ta' dejta għat-test ta' bijodegradazzjoni anaerobika — skeda ta' dejta għas-sustanza tat-test

Laboratorju: Sustanza tat-test: Nru tat-Test:

Temperatura tat-test: (°C): Volum tal-ispazju vojta fuqani (V_h):(l) Volum ta' likwidu (V_l):(l)Karbonju fis-sustanza tal-ittestjar $C_{c,v}$:(mg/l) m_v (¹):(mg)

Jum	p_1 (test) (mbar)	p_2 (test) (mbar)	p_3 (test) (mbar)	p (test) medja (mbar)	p_4 (inbjank) (mbar)	p_5 (inbjank) (mbar)	p_6 (inbjank) (mbar)	p (inbjank) medja (mbar)	p (nett) test — inbjank medja (mbar)	Δp (nett) Kumulattiv (mbar)	m_h C fl-ispazju vojta fuqani (²) (mg)	D_h Bijodegradazzjoni (³) (%)
	$C_{IC, 1}$ test (mg)	$C_{IC, 2}$ test (mg)	$C_{IC, 3}$ test (mg)	C_{IC} medja tat-test (mg)	$C_{IC, 4}$ inbjank (mg)	$C_{IC, 5}$ inbjank (mg)	$C_{IC, 6}$ inbjank (mg)	C_{IC} medja inbjank (mg)	$C_{IC, net}$ test -inbjank medja (mg)	m_l C fil-likwidu (⁴) (mg)	m_t C totali (⁵) (mg)	D_t Bijodegradazzjoni (⁶) (%)
IC (tmien)												
pH (tmien)												

(¹) Karbonju fir-riċipjent tal-ittestjar, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$ (²) Karbonju fl-ispazju vojta fuqani, m_h (mg) f'temperatura ta' inkubazzjoni normali (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$ (³) Bijodegradazzjoni kkalkolata mill-gass tal-ispazju vojta fuqani, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$ (⁴) Karbonju fil-likwidu, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$ (⁵) Karbonju gassifikat totali, m_t (mg): $m_t = m_h + m_l$ (⁶) Bijodegradazzjoni totali, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼ **M6**

Laboratorju: Sustanza ta' referenza: Nru tat-test:

Temperatura tat-test: (°C): Volum tal-ispazju vojta fuqani (V_h):(l) Volum ta' likwidu (V_l) (litri):

Karbonju fis-sustanza ta' referenza $C_{c,v}$ (mg/l): m_v (¹) (mg):

Jum	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) medja (mbar)	p_4 (inib.) (mbar)	p_5 (inib.) (mbar)	p_6 (inib.) (mbar)	p (inib.) medja (mbar)	p (ref.) ref. — inbjank (mbar)	Δp (ref.) kumulattiv (mbar)	m_h C fl-ispazju vojta fuqani (²) (mg)	D_h Bijodegradazzjoni (³) (%)
	$C_{IC, 1}$ ref. (mg)	$C_{IC, 2}$ ref. (mg)	$C_{IC, 3}$ ref. (mg)	C_{IC} medja tar-ref. (mg)	$C_{IC, 4}$ inib. (mg)	$C_{IC, 5}$ inib. (mg)	$C_{IC, 6}$ inib. (mg)	C_{IC} medja ta' inib. (mg)	$C_{IC, net}$ ref. — inib. (mg)	m_l C likwidu (⁴) (mg)	m_t C totali (⁵) (mg)	D_t Bijodegradazzjoni (⁶) (%)
IC (tmien)												
pH (tmien)												

(¹) Karbonju fir-reċipjent tal-ittestjar, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

(²) Karbonju fl-ispazju vojta fuqani, m_h (mg) f'temperatura ta' inkubazzjoni normali (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

(³) Bijodegradazzjoni kkalkolata mill-gass tal-ispazju vojta fuqani, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

(⁴) Karbonju fil-likwidu, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

(⁵) Karbonju gassifikat totali, m_t (mg): $m_t = m_l + m_h$

(⁶) Bijodegradazzjoni totali, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼ M6

C.44. LISSIJA F'KOLONNI TAL-HAMRIJA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-Linja Gwida dwar l-Ittestjar (TG) 312 tal-OECD (2004). Is-sustanzi kimiċi magħmulin mill-bniedem jistgħu jasslu fil-hamrija direttament permezz ta' applikazzjoni deliberata (eż. agrikimiki) jew permezz ta' rotot indiretti (eż. permezz ta' ilma mormi → hama tad-drenaġġ → hamrija jew arja → depożitu mxarrab/xott). Għal valutazzjoni tar-riskju ta' dawn is-sustanzi kimiċi, importanti li jiġi smat il-potenzjal tagħhom li jittrasformaw f'hamrija u għal ċaqliq (lissija) f'saffi iktar fondi tal-hamrija u eventwalment f'ilma ta' taht l-art.
2. Hemm bosta metodi għad-dispożizzjoni sabiex jitkejjel il-potenzjal ta' lissija tas-sustanzi kimiċi fil-hamrija f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati, jiġifieri kromatografija b'saff baxx tal-hamrija, kromatografija b'saff għoli tal-hamrija, kromatografija tal-kolonna tal-hamrija, u kejl tal-assorbiment — disorbiment (1) (2). Għal sustanzi kimiċi mhux jonizzati, il-koeffiċjent tal-partizzjoni tal-n-ottanol-ilma (P_{ow}) jippermetti li tinħareġ stima bikrija tal-potenzjal ta' assorbiment u lissija tagħhom (3)(4)(5).
3. Il-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq kromatografija tal-kolonna tal-hamrija fil-hamrija disturbata (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni). Isiru żewġ tipi ta' esperimenti sabiex jiġu stabbiliti (i) il-potenzjal ta' lissija tas-sustanza kimika tat-test, u (ii) il-potenzjal ta' lissija tal-prodotti ta' trasformazzjoni (studju b'residwi li thallew jiqdiemu) f'hamrija f'kundizzjonijiet tal-laboratorju kkontrollati⁽¹⁾. Il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat fuq metodi eżistenti (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. F'sessjoni ta' hidma tal-OECD dwar l-għażla tal-hamrija/in-naqal, li saret f'Belgirate, l-Italja, fl-1995 (12) intlaħaq qbil fuq in-numru u t-tipi ta' hamrija li għandhom jintużaw f'dan il-metodu ta' ttestjar. Saru wkoll rakkomandazzjonijiet dwar it-teħid, it-tqandil u l-ħżin tal-kampjuni tal-hamrija għall-esperimenti tal-lissija.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

5. Kolonni magħmulin minn materjal inerti xieraq (eż. ħġieġ, azzar inossidabbli, aluminju, teflon, PVC, eċċ.) huma ppakkjati bil-hamrija u wara jiġu saturati u ekwilibriati b'soluzzjoni ta' "xita artifiċjali" (għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 1) u tithalla titbattal. Imbagħad, il-wiċċ ta' kull kolonna jiġi ttrattat bis-sustanza kimika tat-test u/jew b'residwi li jithallew jiqdiemu tas-sustanza kimika tat-test. Imbagħad tiġi applikata xita artifiċjali għall-kolonni tal-hamrija u tingabar il-lissija. Wara l-proċess ta' lissija, il-hamrija titneħħa mill-kolonni u titqassam f'numru xieraq ta' segmenti skont l-informazzjoni meħtieġa mill-istudju. Imbagħad, kull segment tal-hamrija u l-lissija jiġu analizzati għas-sustanza kimika tat-test u, jekk xieraq, għall-prodotti ta' trasformazzjoni jew sustanzi kimiċi oħrajn ta' interess.

APPLIKABBILTÀ TAL-METODU TA' TTESTJAR

6. Il-metodu ta' ttestjar huwa applikabbli għas-sustanzi kimiċi tat-test (mhux ittikketti jew radjutikkettati: eż. ¹⁴C) li għalihom hemm disponibbli metodu analitiku bi preċiżjoni u sensitività suffiċjenti. Il-metodu ta' ttestjar għandu jiġi applikat għas-sustanzi kimiċi li huma volatili mill-hamrija u l-ilma u b'hekk ma jibqgħux fil-hamrija u/jew lissija fil-kundizzjonijiet sperimentali ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

7. Sustanzi kimiċi tat-test mhux ittikketti jew radjutikkettati jistgħu jintużaw sabiex titkejjel l-imġiba tal-lissija fil-kolonni tal-hamrija. Materjal radjutikkettat huwa meħtieġ sabiex tiġi studjata l-lissija tal-prodotti ta' trasformazzjoni

⁽¹⁾ L-istudji ta' lixxivjazzjoni tal-kolonna bi prodotti għall-protezzjoni tal-għeġġel jistgħu jipprovdu informazzjoni dwar il-mobilità dwar sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha u jistgħu jissupplimentaw studji dwar is-sorbiment tal-lott.

▼ M6

(residwi li jithallew jiqdiemu tas-sustanza kimika tat-test) u għad-determinazzjonijiet tal-bilanċ tal-massa.¹⁴C-tikkettar huwa rrakkomandat iżda isotopi oħrajn, bħal ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P, jistgħu jkunu siewja. Kemm jista' jkun, it-tikketta għandha titqiegħed fl-iktar parti(jiet) stabbli tal-molekola. Il-purità tas-sustanza kimika tat-test għandha tkun tal-inqas 95 %.

8. Hafna mis-sustanzi kimiċi għandhom jiġu applikati bħala sustanza waħda. Madankollu, għal sustanzi attivi fil-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, jistgħu jintużaw prodotti fformulati sabiex tiġi studjata l-lissija tas-sustanza tat-test prinċipali iżda l-ittestjar tagħhom huwa meħtieġ b'mod partikolari meta t-tahlita jkollha probabbiltà li taffettwa r-rata ta' hlus (eż. formulazzjonijiet bi hlus ikkontrollat jew granulari). Rigward rekwiżiti speċifiċi għat-tahlita għad-disinn tat-test, jista' jkun siewi li tiġi kkonsultata l-awtorità regolatorja qabel ma jsir it-test. Għal studji dwar il-lissija tar-residwu li jithalla jiqdiem, għandha tintuża s-sustanza tat-test prinċipali pura.
9. Qabel ma jsiru testijiet tal-lissija fil-kolonni tal-ħamrija, idealment għandu jkun hemm disponibbli l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza kimika tat-test:
 - (1) [il-metodu ta' ttestjar A.6] tas-solubilità fl-ilma (13);
 - (2) is-solubilità f'solventi organiċi;
 - (3) [il-metodu ta' ttestjar A.4] tal-pressjoni tal-fwar (13) u l-kostanti tal-Liġi ta' Henry;
 - (4) [il-metodi ta' ttestjar A.8 u A.24] tal-koeffiċjent ta' partizzjoni n-ottanol/ilma (13);
 - (5) il-metodi ta' ttestjar C.18 u/jew C.19 tal-koeffiċjent ta' assorbiment (K_d , K_f or K_{oc}) (13);
 - (6) idrolizi [metodu ta' ttestjar C.7] (13);
 - (7) kostanti ta' dissoċjazzjoni (pK_a) [OECD TG 112] (25);
 - (8) trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-ħamrija [metodu ta' ttestjar C.23] (13)

Nota: It-temperatura li fiha saru dawn il-kejljet għandha tiġi rrapportata fir-rapporti tat-test rispettivi.

10. L-ammont tas-sustanza kimika applikata għall-kolonni tal-ħamrija għandu jkun biżżejjed biex tal-inqas tkun tista' tiġi identifikata 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment. Għal sustanzi kimiċi attivi fi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, l-ammont tas-sustanza kimika tat-test applikat jista' jikkorrispondi għar-rata massima rakkomandata ta' użu (applikazzjoni waħda).
11. Irid ikun hemm disponibbli metodu analitiku xieraq b'reqqa, preċiżjoni u sensitività magħrufin għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u, jekk relevanti, tal-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha fil-ħamrija u l-lissija. Il-limitu ta' detezzjoni analitika għas-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni sinifikanti tagħha (normalment tal-inqas il-prodotti ta' trasformazzjoni kollha ≥ 10 % tad-doża applikata osservata fl-istudji tal-passaġġ tat-trasformazzjoni, iżda idealment kwalunkwe prodott ta' trasformazzjoni ta' thassib) għandu jkun magħruf ukoll (ara l-paragrafu 17).

▼ **M6****SUSTANZI KIMIČI TA' REFERENZA**

12. Sustanzi kimiċi ta' referenza b'imġiba ta' lissija maghrufa bhal atrazina jew monuron li jistgħu jitqiesu bhala lissiji moderati fl-ġhalqa għandhom jintużaw għall-evalwazzjoni tal-mobilità relattiva tas-sustanza kimika tat-test fil-hamrija (1)(8)(11). Sustanza kimika ta' referenza polari mhux sorbenti u mhux degradabbli (eż. titrju, bromur, fluworosseina, eozina) sabiex jiġi traċċat il-moviment tal-ilma fil-kolonna jista' jkun siewi wkoll sabiex jiġu kkonfermati l-karatteristiċi idrodinamiċi fil-kolonna tal-hamrija.
13. Is-sustanzi kimiċi standard analitiċi jistgħu jkunu siewja wkoll għall-karatterizzazzjoni u/jew l-identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni misjubin fis-segmenti tal-hamrija u fil-lissiji permezz ta' metodi kromatografiċi, spettroskopiċi jew oħrajn rilevanti.

DEFINIZZJONIJIET U UNITAJIET

14. Ara l-Appendiċi 1.

KRITERJI TAL-KWALITÀ**Irkupru**

15. Is-somma tal-perċentwali tas-sustanza kimika tat-test misjuba fis-segmenti tal-hamrija u l-lissija tal-kolonna wara li l-lissija tagħti l-irkupru għal esperiment tal-lissija. L-irkupri għandhom ivarjaw minn 90 % sa 110 % għal sustanzi kimiċi radjutikkettati (11) u minn 70 % sa 110 % għal sustanzi kimiċi mhux ittikkettati (8).

Repetibilità u sensitività tal-metodu analitiku

16. Ir-repetibilità tal-metodu analitiku sabiex jiġu kkwantifikati s-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni tista' tiġi vverifikata b'analizi tad-duplikat tal-istess estratt ta' segment tal-hamrija jew ta' lissija (ara l-paragrafu 11).
17. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) tal-metodu analitiku għas-sustanza kimika tat-test u għall-prodotti ta' trasformazzjoni għandu jkun tal-inqas $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ f'kull segment tal-hamrija jew lissija (bhala sustanza kimika tat-test) jew 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment wiehed li jkun l-inqas. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) għandu jkun speċifikat ukoll.

DESKRIZZJONI TAL-METODU TA' TTESTJAR**Sistema ta' ttestjar**

18. Għat-test jintużaw kolonni ta' lissija (li jistgħu jinqatgħu jew le) magħmulin minn materjal inert kif xieraq (eż. ġieġ, azzar inossidabbli, aluminju, teflon, PVC, eċċ.) b'dijametru intern ta' tal-inqas 4 cm u għoli minimu ta' 35 cm. Il-materjali tal-kolonni għandhom jiġu ttestjati għal interazzjonijiet potenzjali mas-sustanza kimika tat-test u/jew il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha. Eżempji ta' kolonni li jistgħu jinqatgħu u daww li ma jistgħux jinqatgħu jintwerew fl-Appendiċi 2.
19. Għall-mili u l-impakkettar tal-kolonni tal-hamrija jintużaw mġharfa, pompa u apparat tal-vibrazzjoni.
20. Għall-applikazzjoni tax-xita artifiċjali għall-kolonni tal-hamrija, jistgħu jintużaw pompi peristaltici jew bil-pistuni, showering heads, fliexken Mariotte jew sempliċi lenbut bi fluss kontrollat.

▼ **M6****Tagħmir tal-laboratorju u sustanzi kimiċi**

21. Huwa mehtieg tagħmir standard tal-laboratorju, b'mod partikolari dan li ġej:

- (1) strumenti analitiċi bħal tagħmir tal-GLC, HPLC u TLC, inklużi s-sistemi xierqa ta' detezzjoni għall-analiżi tas-sustanzi kimiċi ttikkettati jew mhux ittikkettati jew metodu ta' dilwizzjoni tal-isotopi inversi;
- (2) strumenti għal skopijiet ta' identifikazzjoni (eż. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, eċċ.);
- (3) kontatur tax-xintillar likwidu għal sustanza kimika tat-test radjuttikkettata;
- (4) ossidizzant għall-kombustjoni ta' materjal ittikkettat;
- (5) apparat ta' estrazzjoni (pereżempju, tubi ta' ċentrifugi għal estrazzjoni fil-kesha u apparat Soxhlet għal estrazzjoni kontinwa taħt rifluss);
- (6) strumentazzjoni għall-koncentrazzjoni ta' soluzzjonijiet u estratti (eż. evaporatur rotanti).

22. Is-sustanzi kimiċi użati jinkludu: solventi, grad analitiku, bħal aċetun, metanol, eċċ.; xintillar likwidu; soluzzjoni ta' 0,01 M CaCl₂ f'ilma distillat jew dejonizzat (= xita artifiċjali).

Sustanza kimika tat-test

23. Biex tiġi applikata s-sustanza kimika tat-test għall-kolonna tal-ħamrija, din għandha tiġi dissolta fl-ilma (dejonizzata jew distillata). Jekk is-sustanza kimika tat-test f'tit li xejn hija solubbli fl-ilma, tista' tiġi applikata jew bħala prodott ifformulat (jekk hemm bżonn wara sospensjoni jew emulsifikazzjoni fl-ilma) jew f'xi solvent organiku. F'każ li jintuza solvent organiku, għandu jinzamm għall-minimu u għandu jiġi evaporat mill-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija qabel ma tinbeda l-proċedura ta' lissija. Formulazzjonijiet solidi, bħal granuli, għandhom jiġu applikati fil-forma solida mingħajr ilma; biex tkun tista' ssir distribuzzjoni aħjar tul il-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija, il-prodott ifformulat jista' jithallat ma' ammont żgħir ta' ramel kwarzuż (eż. 1 g) qabel l-applikazzjoni.

24. L-ammont tas-sustanza kimika tat-test applikata għall-kolonna tal-ħamrija għandu jkun biżżejjed sabiex tkun tista' tiġi identifikata 0,5 % tad-doża applikata fi kwalunkwe segment. Għal sustanzi attivi fi prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, dan jista' jkun ibbażat fuq rata ta' użu massima rrakkomandata (rata ta' applikazzjoni unika) u, kemm għal lissija prinċipali u li thalliet tiqdiem, għandu jkun marbut mal-erja tas-superfiċje tal-kolonna tal-ħamrija użata ⁽¹⁾.

Sustanza kimika ta' referenza

25. Għandha tintuza sustanza kimika ta' referenza fl-esperimenti tal-lissija (ara l-paragrafu 12). Għandha tiġi applikata għall-wiċċ tal-kolonna tal-ħamrija b'mod simili bhas-sustanza kimika tat-test u b'rata xierqa li tippermetti detezzjoni

⁽¹⁾ L-ammont li jrid jiġi applikat għall-kolonna tal-ħamrija ċilindrika jista' jiġi kkalkolat bil-formula li ġejja:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g/kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

fejn:

M = l-ammont applikat għal kull kolonna [μg]

A = ir-rata ta' applikazzjoni [kg · ha⁻¹]

d = id-dijametru tal-kolonna tal-ħamrija [cm]

π = 3,14

▼ **M6**

adegwata jew bħala standard intern flimkien mas-sustanza kimika tat-test fuq l-istess kolonna tal-hamrija jew inkella waħedha fuq kolonna tal-hamrija separata. Idealment iż-żewġ sustanzi kimiċi jiġu applikati fuq l-istess kolonna, għajr meta ż-żewġ sustanzi kimiċi jkunu ttikkettati b'mod simili.

Hamrija*Għażla tal-hamrija*

26. Għal studji dwar il-lissija bis-sustanza kimika tat-test prinċipali għandhom jintużaw 3 sa 4 hamrija b'pH, kontenut ta' karbonju organiku u sawra varjanti (12). Fit-Tabella 1 ta' hawn taht tinghata gwida għall-għażla ta' hamrija għall-esperimenti ta' lissija. Għal sustanzi kimiċi tat-test jonizzabbli, il-hamrija magħżulin għandhom ikopru firxa wiesgħa ta' pH, sabiex tiġi evalwata l-mobilità tas-sustanza kimika fil-forom jonizzati u mhux jonizzati tagħha; tal-inqas 3 hamrija għandu jkollhom pH li fiha s-sustanza kimika tat-test tkun fil-forma mobbli tagħha.

*Tabella 1***Gwida għall-għażla ta' hamrija għal studji dwar il-lissija**

Nru tal-Hamrija	Valur tal-pH	Karbonju organiku %	Kontenut ta' tafal %	Sawra (*)
1	> 7,5	3,5 — 5,0	20 — 40	lom tat-tafal
2	5,5 — 7,0	1,5 — 3,0	15 — 25	lom tal-fajd
3	4,0 — 5,5	3,0 — 4,0	15 — 30	lom
4	< 4,0 — 6,0 §	< 0,5 — 1,5 § ‡	< 10 — 15 §	ramel grass
5	< 4,5	> 10 #	< 10	ramel grass/ramel

(*) Skont is-sistemi tal-FAO u l-USDA (14).

§ Idealment, il-varjabbli rispettivi għandhom juru valuri li jaqgħu fi hdan il-medda mogħtija. Madankollu, jekk ikun hemm diffikultajiet fis-sejbien tal-materjal tal-hamrija xieraq, jiġu aċċettati valuri inqas mill-minimu indikat.

‡ Hamrija b'karbonju organiku ta' inqas minn 0,3 % jistgħu jxekklu l-korrelazzjoni bejn kontenut organiku u assorbiment. B'hekk, huwa rrakkomandat li jintużaw hamrija b'kontenut minimu ta' karbonju organiku ta' 0,3 %.

Hamrija b'kontenut ta' karbonju għoli hafna (eż. > 10 %) jaf ma jkunux legalment aċċettabbli eż. għal finijiet ta' reġistrazzjoni tal-pestiċidi.

27. Kultant jistgħu jkunu meħtieġa tipi oħrajn ta' hamrija sabiex jirrappreżentaw reġjuni iktar kishin, sħan u tropikali. Għaldaqstant, jekk ikunu ppreferiti tipi oħrajn ta' hamrija, għandhom jiġu kkaratterizzati bl-istess parametri u għandu jkollhom varjazzjonijiet simili bħal dawk deskritti fil-gwida għall-għażla tal-hamrija għal studji dwar il-lissija (ara t-Tabella 1 iktar 'il fuq), anki jekk ma jkunux jaqblu mal-kriterji bl-eżatt.

28. Għall-istudji dwar il-lissija b'“residwi li thallew jiqdiemu”, għandha tintuża hamrija waħda (12). Għandu jkollha kontenut ta' ramel ta' > 70 % u kontenut ta' karbonju organiku ta' bejn 0,5 — 1,5 % (eż. Nru tal-hamrija 4 fit-Tabella 1). Jista' jkun hemm bżonn li jintużaw iktar minn tip wieħed ta' hamrija jekk id-dejta dwar il-prodotti ta' trasformazzjoni tkun importanti.

29. Il-hamrija kollha għandhom ikunu kkaratterizzati tal-inqas għas-sawra [% ramel, % fajd, % tafal skont is-sistemi ta' klassifikazzjoni tal-FAO u l-USDA (14)], il-pH, il-kapaċità ta' skambju ta' katjoni, il-kontenut ta' karbonju organiku, id-densità grossa (għal hamrija disturbata) u l-kapaċità

▼ **M6**

ta' felhan ta' ilma. Il-kejl tal-bijomassa mikrobjali huwa mehtieg biss għall-hamrija li tintuża fil-perjodu ta' inkubazzjoni/li fih tithalla tiqdiem imwettaq wara l-esperiment ta' lissija li tithalla tiqdiem. Informazzjoni dwar karatteristiċi addizzjonali tal-hamrija (eż. klassifikazzjoni tal-hamrija, mineraloġija tat-tafal, erja tas-superfiċje speċifika) tista' tkun siewja sabiex jiġu interpretati r-risultati ta' dan l-istudju. Sabiex jiġu stabbiliti l-karatteristiċi tal-hamrija, jistgħu jintużaw il-metodu rrakkomandati fir-referenzi (15)(16)(17)(18)(19).

Il-għbir u l-ħzin tal-hamrija

30. Il-hamrija għandhom jittiehdu mis-saff ta' fuq (orizzont-A) sa fond massimu ta' 20 cm. Il-fdalijiet ta' veġetazzjoni, makrofawna u iġbla għandhom jitnehhew. Il-hamrija (hlief dawk użati biex is-sustanza kimika tat-test tithalla tiqdiem) jitnixxu bl-arja f'temperatura tal-kamra (ideament bejn 20-25 °C). Id-disaggregazzjoni għandha ssir b'saħħa minima, sabiex is-sawra oriġinali tal-hamrija tinbidel bl-inqas mod possibbli. Il-hamrija huma mgharbula minn passatur ta' ≤ 2 mm. Hija rrakkomandata omoġenizzazzjoni bir-reqqa, peress li din issaħħah ir-riproducibilità tar-risultati. Qabel ma jintużaw, il-hamrija jistgħu jinħażnu f'temperatura ambjentali u jitnixxfu bl-arja (12). Ma huwa rrakkomandat ebda limitu iżda l-hamrija maħżunin għal iktar minn 3 snin għandhom jerggħu jiġu analizzati qabel ma jintużaw fir-rigward tal-kontenut ta' karbonju organiku u l-pH tagħhom.

31. Għandu jkun hemm għad-dispożizzjoni informazzjoni ddettaljata dwar l-istorja tas-siti tal-ghelieqi mnejn jingabru l-hamrija tat-test. Id-dettalji jinkludu l-post eżatt [iddefiniti bl-eżatt mill-UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) jew il-koordinati ġeografici], il-kopertura tal-veġetazzjoni, it-trattamenti b'fertilizzanti organiċi u inorganiċi, zidiet ta' materjali bijoloġiċi jew kontaminazzjoni inċidentali (12). Jekk il-hamrija tiġi ttrattata bis-sustanza kimika tat-test jew l-analogi strutturali tagħha fl-erba' snin ta' qabel, dawn il-hamrija ma għandhomx jintużaw għal studji dwar il-lissija.

Kundizzjonijiet tat-test

32. Matul il-perjodu ta' ttestjar, il-kolonni ta' lissija tal-hamrija għandhom jinżammu fid-dlam f'temperatura ambjentali sakemm din it-temperatura tinżamm fi hdan il-medda ta' ± 2 °C. It-temperaturi rrakkomandati huma ta' bejn 18 u 25 °C.

33. Għandha tiġi applikata xita artifiċjali (0,01 M CaCl₂) kontinwament fuq wiċċ il-kolonni tal-hamrija b'rata ta' 200 mm tul perjodu ta' 48 siegħa⁽¹⁾; din ir-rata hija ekwivalenti għal applikazzjoni ta' 25 l għal kolonna b'dijametru intern ta' 4 cm. Jekk ikunu mehtieġa għall-fini tat-test, jistgħu jintużaw ukoll rati oħrajn ta' xita artifiċjali u ta' durata itwal.

*Twettiq tat-test**Lissija b'sustanza kimika tat-test prinċipali*

34. Tal-inqas, kolonni ta' lissija ta' duplikati jiġu mpakkettati b'hamrija mhux ittrattata, imnixxfa bl-arja u mgharbula (< 2 mm) b'għoli li jaqsa sa madwar 30 cm. Biex jinkiseb ippakkjar uniformi, il-hamrija tiddaħhal fil-kolonni f'porzjonijiet żgħir b'imgharfa u titniżżel l-isfel b'pompa b'vibrazzjoni simultanja hafifa tal-kolonni sakemm il-quċċata tal-kolonni tal-hamrija ma tinzilx iktar. L-ippakkjar uniformi huwa mehtieġ sabiex jinkisbu risultati riproduttivi minn kolonni ta' lissija. Għal dettalji dwar tekniki ta' ppakkettjar

⁽¹⁾ Dan jissimula ammont kbir ta' xita. Ix-xita annwali medja, pereżempju, fl-Ewropa Ċentrali, hija fl-ordni ta' 800-1 000 mm.

▼ M6

- tal-kolonna, ara r-referenzi (20)(21) u (22). Biex tiġi kkontrollata r-riproduċibilità tal-proċedura ta' ppakkjar, jiġi stabbilit il-piż shiħ tal-hamrija ppakkjata fil-kolonna. ⁽¹⁾; il-piżijiet tal-kolonna ta' duplikati għandhom ikunu simili.
35. Wara l-impakkettar, il-kolonna tal-hamrija jixxarrbu minn qabel b'xita artifiċjali (0,01 M CaCl₂) mill-qiegħ sa fuq sabiex l-arja fil-pori tal-hamrija tiġi spostata bl-ilma. Wara, il-kolonna tal-hamrija jithallew jekwilibraw u l-ilma żejjed jitbattal bil-gravità. Il-metodi għas-saturazzjoni tal-kolonna huma riveduti fir-referenza (23).
36. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test u/jew is-sustanza kimika ta' referenza jiġu applikati għall-kolonna tal-hamrija (ara wkoll il-paragrafi 23-25). Biex tinkiseb distribuzzjoni omoġena, is-soluzzjonijiet, is-sospensjonijiet jew l-emulsjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u/jew ta' referenza għandhom jiġu applikati ndaqs fuq il-wiċċ tal-kolonna tal-hamrija. Jekk tkun irrakkomandata inkorporazzjoni fil-hamrija għall-applikazzjoni ta' sustanza kimika tat-test, għandha tithallat f'ammont żgħir (eż. 20 g) ta' hamrija u tiżdied fuq wiċċ il-kolonna tal-hamrija.
37. Imbagħad l-uċuħ tal-kolonna tal-hamrija jitgħattew b'disk tas-sinter tal-ħġieġ, perli tal-ħġieġ, filtri tal-fibra tal-ħġieġ jew karta filtru tonda biex ix-xita artifiċjali tiġi distribwita b'mod ekwu fuq il-wiċċ shiħ u jiġi evitat milli jiġi disturbat il-wiċċ tal-hamrija minħabba l-qtar tax-xita. Iktar ma jkun kbir id-dijametru tal-kolonna, iktar trid toqghod attent fl-applikazzjoni tax-xita artifiċjali fuq il-kolonna tal-hamrija sabiex tiġi żgurata distribuzzjoni ndaqs tax-xita artifiċjali fuq il-wiċċ tal-hamrija. Imbagħad, ix-xita artifiċjali tiżdied mal-kolonna tal-hamrija qatra, qatra bl-ghajnuna ta' pistun jew pompa peristaltika jew lenbut bi fluss kontrollat. Idealment, il-lissiji għandhom jingabru fi frazzjonijiet u l-volumi rispettivi tagħhom jiġu rreġistrati ⁽²⁾.
38. Wara l-lissija u wara li l-kolonna jithallew jitbattlu, il-kolonna tal-hamrija jitqassmu f'numru xieraq ta' segmenti skont l-informazzjoni meħtieġa mill-istudju, is-segmenti jiġu estrattati b'solventi xierqa jew taħlitiet ta' solventi u jiġu analizzati għas-sustanza kimika tat-test u, meta jkun xieraq, għal prodotti ta' trasformazzjoni, għar-radjuattività totali u għas-sustanza kimika ta' referenza. Il-lissiji jew il-frazzjonijiet tal-lissiji jiġu analizzati direttament jew wara l-estrazzjoni għall-istess prodotti. Meta tintuża sustanza kimika tat-test radjutikkettata, għandhom jiġu identifikati l-frazzjonijiet kollha li fihom $\geq 10\%$ tar-radjuattività applikata.

Lissija b'residwi li jithallew jiqdiemu

39. Hamrija għda (mhux imnixxa bl-arja qabel) tiġi trattata b'rata li tikkorrispondi għall-erja tas-superfiċje tal-kolonna tal-hamrija (ara l-paragrafu 24) bis-sustanza kimika tat-test radjutikkettata u inkubata f'kundizzjonijiet aerobiċi skont il-Metodu ta' Ttestjar C.23 (13). Il-perjodu ta' inkubazzjoni (li fih tithalla tiqdiem) għandu jkun twil biżżejjed biex jiġu prodotti ammonti sinifikanti ta' prodotti ta' trasformazzjoni; huwa rrakkomandat perjodu li fih

⁽¹⁾ Dawn li ġejjin huma eżempji ta' densitajiet bl-ingrossa għal hamrija disturbati: għal hamrija ramlija 1,66 g · ml⁻¹
għal hamrija ramlija tal-lom 1,58 g · ml⁻¹
għal hamrija tal-lom 1,17 g · ml⁻¹
għal hamrija tal-fajd = 1,11 g · ml⁻¹

⁽²⁾ Il-volumi tipiċi tal-lissiji jvarjaw minn 230-260 ml li jikkorrispondu għal madwar 92-104 % tax-xita artifiċjali totali applikata (251 ml) meta jintużaw kolonna tal-hamrija b'dijametru ta' 4 cm u tul ta' 30 cm.

▼ M6

tithalla tiqdiem ta' nofs hajja wahda tas-sustanza kimika tat-test⁽¹⁾, izda ma ghandux jaqbez il-120 jum. Qabel il-lissija, il-hamrija li tithalla tiqdiem tigi analizzata ghas-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni taghha.

40. Il-kolonna ta' lissija huma ppakkjati sa gholi ta' 28 cm bl-istess hamrija (izda jitnixxfu bl-arja) kif uzata fl-esperiment li fih tithalla tiqdiem kif deskritt fil-paragrafu 34 u l-piż totali tal-kolonna tal-hamrija ppakkjati jiġi stabbilit ukoll. Imbagħad, il-kolonna tal-hamrija jixxarrbu minn qabel kif spjegat fil-paragrafu 35.
41. Imbagħad, is-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni taghha jiġu applikati fuq wiċċ il-kolonna tal-hamrija fil-forma ta' residwi tal-hamrija li jithallew jiqdiemu (ara l-paragrafu 39) bħala segment tal-hamrija ta' 2 cm. Idealment, l-gholi totali tal-kolonna tal-hamrija (hamrija mhux ittrattata + hamrija li tithalla tiqdiem) ma ghandux jaqbez it-30 cm (ara l-paragrafu 34).
42. Il-lissija ssir kif spjegat fil-paragrafu 37.
43. Wara l-lissija, is-segmenti tal-hamrija u l-lissiji jiġu analizzati kif indikat fil-paragrafu 38 ghas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni taghha u r-radjuattività mhux estratta. Biex jiġi stabbilit kemm ir-residwu li jithalla jiqdiem jinzamm fis-saff ta' fuq ta' 2 cm wara l-lissija, dan is-segment għandu jiġi analizzat għalih.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

44. L-ammonti tas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni, daww mhux estrattabbli u, jekk inkluzi, tas-sustanza kimika ta' referenza għandhom jingħataw f' % ta' doża inizjali applikata għal kull segment tal-hamrija u frazzjoni tal-lissija. Għandha tingħata preżentazzjoni grafika għal kull kolonna billi jiġu plottjati l-perċentwali misjubin bħala funzjoni tal-fondi tal-hamrija.
45. Meta sustanza kimika ta' referenza tkun inkluzi f'dawn l-istudji dwar il-lissija tal-kolonna, il-lissija ta' sustanza kimika tista' tigi evalwata fuq skala relattiva li tuża fatturi ta' mobilità relattiva (RMF; għad-definizzjoni ara l-Appendiċi 3) (1)(11) li biha tkun tista' titqabbell dejta dwar il-lissija ta' bosta sustanzi kimiċi miksubin b'tipi ta' hamrija differenti. Fl-Appendiċi 3 jingħataw eżempji ta' valuri tal-RMF għal firxa ta' sustanzi kimiċi għall-protezzjoni tal-uċuħ tar-raba'.
46. Stimu tal- K_{oc} (il-koeffiċjent ta' assorbiment normalizzat għall-karbonju organiku) u l- K_{om} (koeffiċjent ta' distribuzzjoni normalizzat għall-materja organika) jistgħu jinkisbu wkoll mir-riżultati ta' lissija tal-kolonna bl-użu ta' distanza medja ta' lissija jew korrelazzjonijiet stabbiliti bejn l-RMF u l- K_{om} rispettivament K_{oc} (4) jew bl-applikazzjoni ta' sempliċi teorija ta' kromatografika (24). **Madankollu, l-ahhar metodu għandu jintuża bil-galbu, speċjalment meta jitqies li l-proċess ta' lissija ma jinvolvi biss kundizzjonijiet ta' fluss saturati, izda anki sistemi mhux saturati.**

⁽¹⁾ Jista' jiġi fformat prodott wieħed kbir ta' trasformazzjoni f'hamrija li anki din tista' tidher f'punti ta' żmien differenti matul studju ta' trasformazzjoni. F'dawn il-kazijiet, jista' jkun hemm bżonn li jsiru studji dwar il-lixxivjazzjoni b'residwi li thallew jiqdiemu għal żminijiet differenti.

▼ **M6****Interpretazzjoni tar-riżultati**

47. L-istudji dwar il-lissija tal-kolonna deskritti f'dan il-metodu jippermettu sabiex jiġi stabbilit il-potenzjal ta' lissija jew mobilità fil-hamrija tas-sustanza kimika tat-test (fl-istudju dwar il-lissija prinċipali) u/jew il-prodotti ta' trasformazzjoni tagħha (fl-istudju dwar il-lissija tar-residwu li jithalla jiqdiem). Dawn it-testijiet ma jwassrux b'mod kwantitattiv l-imġiba ta' lissija fil-kundizzjonijiet tal-ghalqa, iżda jistgħu jintużaw biex iqabblu l-“lixxivjabbiltà” ta' sustanza kimika ma' oħrajn b'imġiba ta' lissija li jaf tkun magħrufa (24). Lanqas ma jkejlu b'mod kwantitattiv il-perċentwal tas-sustanza kimika applikata li tista' tilhaq l-ilma ta' taht l-art (11). Madankollu, ir-riżultati tal-istudji dwar il-lissija tal-kolonna jistgħu jgħinu biex jiġi deċiż jekk iridx isir ittestjar addizzjonali ta' nofs l-ghalqa jew tal-ghalqa mwettaq għal sustanzi kimiċi b'potenzjal kbir ta' mobilità f'testijiet tal-laboratorju.

Rapport tat-test

48. Ir-rapport irid jinkludi:

Sustanza kimika tat-test u sustanza kimika ta' referenza (meta tintuża):

- l-isem komuni, l-isem tas-sustanza kimika (nomenklatura tas-CAS u l-IUPAC), in-numru tas-CAS, l-istruttura kimika (inkluża l-pożizzjoni tat-tikketta meta jintuża materjal radjutikkettat) u l-karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti;
- il-puritajiet (impuritajiet) tas-sustanza kimika tat-test;
- il-purità radjukimika tas-sustanza kimika ttikkettata u l-attività speċifika (fejn xieraq).

Hamrija tat-test:

- dettalji dwar il-post tal-gbir;
- il-karatteristiċi tal-hamrija, bħall-pH, il-karbonju organiku u l-kontenut ta' tafal, is-sawra u d-densità bl-ingrossa (għal hamrija disturbata);
- l-attività mikrobjali tal-hamrija (iżda biss għal hamrija użata sabiex is-sustanza kimika tat-test tithalla tiqdiem);
- it-tul tal-ħzin tal-hamrija u l-kundizzjonijiet ta' ħzin tagħha.

Kundizzjonijiet tat-test:

- id-dati ta' meta saru l-istudji;
- it-tul u d-dijametru tal-kolonna ta' lissija;
- il-piż totali tal-hamrija tal-kolonna tal-hamrija;
- l-ammont tas-sustanza kimika tat-test u, jekk xieraq, is-sustanza kimika ta' referenza applikata;
- l-ammont, il-frekwenza u d-durata tal-applikazzjoni tax-xita artifiċjali;
- it-temperatura tas-sistema tal-esperiment;
- in-numru ta' rreplikati (tal-inqas tnejn);
- il-metodi għall-analiżi tas-sustanza kimika tat-test, il-prodotti ta' trasformazzjoni u, fejn xieraq, tas-sustanza kimika ta' referenza fil-bosta segmenti u lissiji tal-hamrija;
- il-metodi għall-karatterizzazzjoni u l-identifikazzjoni tal-prodotti ta' trasformazzjoni fis-segmenti tal-hamrija u l-lissiji.

▼ **M6***Riżultati tat-test:*

- it-tabelli tar-riżultati mogħtijin bħala konċentrazzjonijiet u bħala % tad-doza applikata għas-segmenti u l-lissiji tal-hamrija;
- il-bilanċ tal-massa, jekk xieraq;
- il-volumi tal-lissija;
- id-distanzi tal-lissija u, fejn xieraq, il-fatturi rilevanti tal-mobilità;
- il-plott grafiku ta' % misjuba fis-segmenti tal-hamrija kontra l-fond tas-segment tal-hamrija;
- diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

LETTERATURA

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) L-Anness I għad-Direttiva tal-Kummissjoni 95/36/KE tal-14 ta' Lulju 1995 li temenda d-Direttiva tal-Kunsill 91/414/KEE li tirrigwarda t-tqegħid fis-suq tal-prodotti għall-protezzjoni tal-pjanti, ĠU L 172, 22.7.1995, p. 8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/-Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (13) Il-kapitli li ġejjin ta' dan l-Anness:

Il-Kapitolu A.4, pressjoni tal-fwar

Il-Kapitolu A.6, Solubilità fl-ilma

▼ **M6**

Il-Kapitolu A.8, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu tal-flask mhežżeż

Il-Kapitolu A.24, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu HPLC

Il-Kapitolu C.7, degradazzjoni — degradazzjoni abijotika: idrolizi bħala funzjoni tal-pH

Il-Kapitolu C.18, Assorbiment/disorbiment bl-użu ta' metodu ta' ekwilibriju tal-lott

Il-Kapitolu C.23, Trasformazzjoni aerobika u anaerobika fil-hamrija

- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).
- (15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition
- (16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Streck, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.
- (24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.
- (25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet u unitajiet**

Residwu tal-hamrija li jithalla jiqdiem: Is-sustanza kimika tat-test u l-prodotti ta' trasformazzjoni preżenti fil-hamrija wara l-applikazzjoni u wara perjodu twil biżżejjed biex il-proċessi ta' trasport, assorbiment, metabolizmu, u dissipazzjoni jibdli d-distribuzzjoni u l-ghamla kimika ta' whud mis-sustanzi kimiċi applikati (1).

Xita artifiċjali: soluzzjoni ta' 0,01 M CaCl_2 filma distillat jew dejonizzat.

Distanza Medja ta' Lissija: Il-qiegh tat-taqsim tal-hamrija fejn is-sustanza kimika rkuprata kumulattiva = 50 % tas-sustanza kimika tat-test totali rkuprata [esperiment normali tal-lissija], jew; (il-qiegh tat-taqsim tal-hamrija fejn is-sustanza kimika rkuprata kumulattiva = 50 % tas-sustanza kimika tat-test totali rkuprata) — ((il-hxuna tas-saff tar-residwu li thalla jiqdiem)/2) [l-istudju dwar il-lissija tar-residwu li thalla jiqdiem]

Sustanza kimika: sustanza jew tahlita.

Lissija: Il-faži milwiema perkolata minn profil tal-hamrija jew kolonna tal-hamrija (1).

Lissija: Proċess li bih sustanza kimika tinzel 'l isfel minn ġol-profil tal-hamrija jew kolonna tal-hamrija (1).

Distanza ta' lissija: L-iktar segment fond tal-hamrija li fih instab $\geq 0,5$ % tas-sustanza kimika tat-test applikata jew ir-residwu li thalla jiqdiem wara l-proċess ta' lissija (ekwivalenti għall-fond tal-penetrazzjoni).

Limitu ta' detezzjoni (LOD) u limitu tal-kwantifikazzjoni (LOQ): Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li f'livell inqas minnha l-identità tas-sustanza kimika ma tkunx tista' tiġi differenzjata minn artefatti analitiċi. Il-limitu ta' kwantifikazzjoni (LOQ) huwa l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika li f'livell inqas minnha l-konċentrazzjoni ma tkunx tista' tiġi stabbilita bi preċiżjoni aċċettabbli.

Fattur ta' Mobilità Relattiva tal-RMF: (distanza ta' lissija tas-sustanza kimika tat-test (cm)) / (distanza ta' lissija tas-sustanza kimika ta' referenza (cm))

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

Prodott ta' trasformazzjoni: Is-sustanzi kimiċi kollha li jirriżultaw minn reazzjonijiet ta' trasformazzjoni bijotiċi jew abijotiċi tas-sustanza kimika tat-test inklużi CO_2 u prodotti li huma maqbudin f'residwi.

Hamrija: Tahlita ta' kostitwenti minerali u organiċi tas-sustanzi kimiċi, b'dawn tal-aħhar li fihom komposti ta' kontenut għoli ta' karbonju u nitroġenu u piżijiet molekulari kbar, popolati b'organizmi żgħar (hafna minnhom mikroorganizmi). Il-hamrija tista' titqandel f'żewġ stati:

— mhux disturbata, kif żviluppat maż-żmien, f'saffi karatteristiċi ta' firxa ta' tipi ta' hamrija;

— disturbata, kif normalment tinstab fir-raba' jew kif issehh meta jittiehdu kampjuni bit-thaffir u jintużaw f'dan il-metodu ta' ttestjar (2).

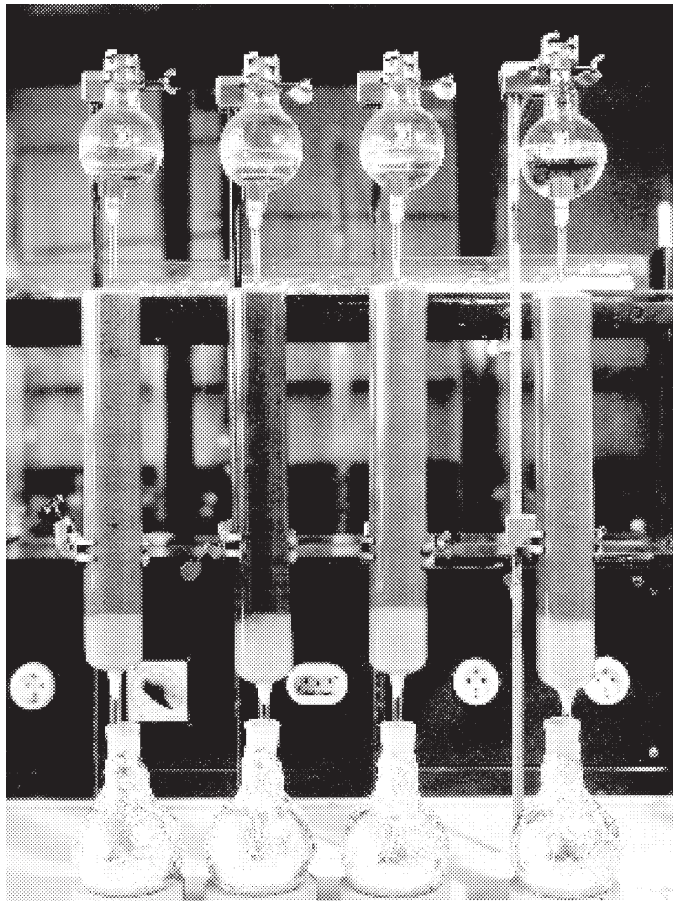
(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼ **M6***Appendiċi 2**Figura 1*

Eżempju ta' kolonni ta' lissija li ma jistghux jinqatghu maghmulin mill-ħġieġ

B'tul ta' 35 cm u dijametru intern ta' 5 cm (1)



← Imbiebet bi fluss kontrollat għall-appikazzjoni ta' xita artifiċjali

← Disk tas-sinter tal-ħġieġ biex jiġi evitat mili jiġi disturbat il-wiċċ tal-ħamrija u sabiex ix-xita artifiċjali titqassam indaqs

← Kolonna tal-ħġieġ mimlija ħamrija tat-test (meta jiġu ttestjati prodotti fotolabbli, il-kolonni għandhom jitgeżwru f'fojl tal-aluminju)

← Saff ramel kwarż

← Tapp tas-suf tal-ħġieġ biex il-ħamrija tinżamm fil-kolonna

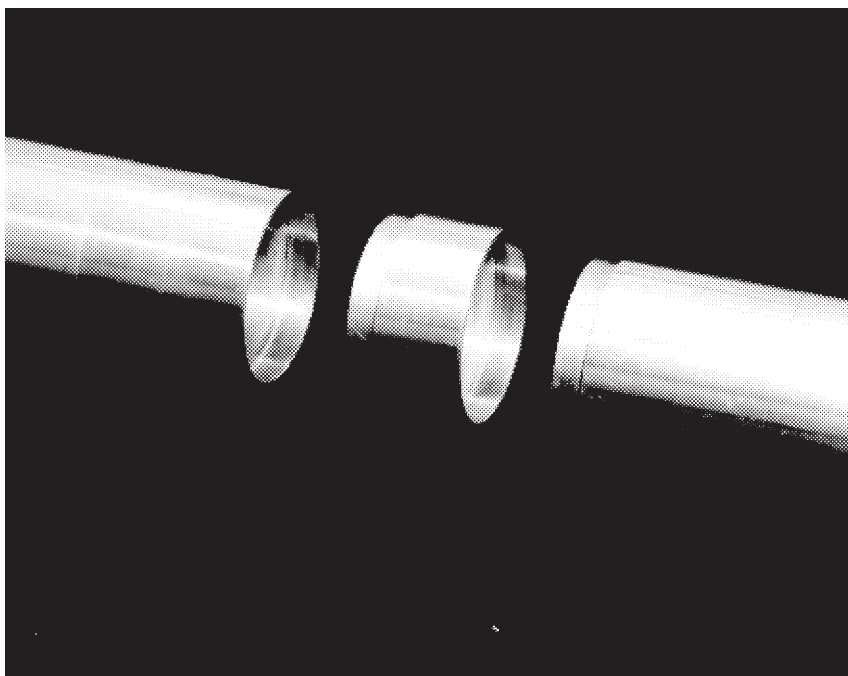
← Flask b'qiegħ tond għall-ġbir tal-lissija; imgeżwer f'fojl tal-aluminju biex tiġi eskluża fotolizi

- (1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼ M6

Figura 2

Eżempju ta' kolonna tal-metall li tista' tinqata' b'dijametru intern ta' 4 cm (1)



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.

▼ **M6**

Appendiċi 3

Eżempji ta' Fatturi ta' Mobilità Relattiva (*) (RMF) għal firxa ta' Sustanzi kimiċi għall-protezzjoni tal-uċuħ tar-raba' (1)(2) u l-klassijiet ta' mobilità korrispondenti (+)

Medda tal-RMF	Sustanza Kimika (RMF)	Klassi tal-Mobilità
≤ 0,15	Paratjon (< 0,15), Flurodifin (0,15)	Iimmobbli
0,15 — 0,8	Profenofos (0,18), Propikonażol (0,23), Djazinon (0,28), Djuron (0,38), Terbutilażina (0,52), Metidatjon (0,56), Prometrin (0,59), Propažina (0,64), Alaklor (0,66), Meto-laklor (0,68)	II fitt mobbli
0,8 — 1,3	Monuron (**) (1,00), Atrazina (1,03), Simažina (1,04), Fluwometuron (1,18)	III moderatament mobbli
1,3 — 2,5	Prometon (1,67), Ċianažina (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilate (1,98)	IV kemxejn mobbli
2,5 — 5,0	Karbofuran (3,00), Diossakarb (4,33)	V mobbli
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), Dikrotofos (> 5,0)	VI mobbli hafna

(*) II-Fattur tal-Mobilità Relattiva huwa derivat kif ġej (3):

$$RMF = \frac{id - \text{distanza ta' lissija tas} - \text{sustanza kimika tat} - \text{test(cm)}}{id - \text{distanza ta' lissija tas} - \text{sustanza kimika ta' referenza(cm)}}$$

(**) Sustanza kimika ta' referenza

+ Sistemi oħrajn biex tiġi kklassifikata l-mobilità ta' sustanza kimika fil-hamrija huma bbażati fuq il-valuri tal- R_f mill-kromatografija tas-saff irqiq tal-hamrija (4) u fuq valuri tal- K_{oc} (5)(6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium "Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment." Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- (2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

▼ M6

C.45. STIMA TAL-EMISSIONIJET MILL-INJAM ITTRATTAT BIL-PRESERVATTIV FL-AMBJENT: IL-METODU TAL-LABORATORJU GHALL-KOMODITAJIET TAL-INJAM LI MHUMIEX KOPERTI U LI HUMA F'KUNTATT MA' ILMA HELU JEW ILMA BAHAR

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida dwar l-ittestjar (TG) 313 tal-OECD (2007). L-emissjonijiet mill-injam ittrattat bil-preservattiv fl-ambjent iridu jiġu kkwantifikati sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-injam ittrattat. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi metodu tal-laboratorju għall-istima tal-emissjonijiet minn injam ittrattat bil-preservattiv f'żewġ sitwazzjonijiet li fihom l-emissjonijiet jistgħu jidhlu fl-ilma:
 - Emissjonijiet minn injam ittrattat f'kuntatt ma' ilma helu. Emissjonijiet mill-wiċċ tal-injam ittrattat jistgħu jidhlu fl-ilma.
 - Emissjonijiet minn injam ittrattat f'kuntatt ma' ilma baħar. Emissjonijiet mill-wiċċ tal-injam ittrattat jistgħu jidhlu fl-ilma baħar.
2. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa mahsub sabiex jiġu ttestjati l-emissjonijiet mill-injam u komoditajiet tal-injam li mhumiex koperti u li huma f'kuntatt ma' ilma helu jew ilma baħar. Il-Klassijiet tal-Użu jintużaw b'mod internazzjonali u jikkategorizzaw il-periklu bijoloġiku li għalih ser tkun soġġetta l-komodità ttrattata. Il-Klassijiet tal-Użu jiddefinixxu wkoll is-sitwazzjoni li fiha tintuża l-komodità ttrattata u jistabbilixxu l-kompartimenti ambjentali (arja, ilma, ħamrija) li huma f'riskju potenzjali mill-injam ittrattat bil-preservattiv.
3. Il-metodu ta' ttestjar huwa proċedura tal-laboratorju għall-kisba ta' kampjuni (emissat) minn ilma li fih jiġthaddas l-injam ittrattat, f'intervalli ta' żmien dejjem itwal wara l-espożizzjoni. Il-kwantità ta' emissjonijiet fl-emissat hija marbuta mal-erja tas-superfiċje tal-injam u t-tul tal-espożizzjoni, sabiex jiġi stmat fluss f'mg/m²/jum. B'hekk ikun jista' jiġi stmat il-fluss (rata ta' lissija) wara perjodi dejjem itwal ta' espożizzjoni.
4. Il-kwantità ta' emissjonijiet tisa' tintuża f'valutazzjoni tar-riskju ambjentali tal-injam ittrattat.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI

5. Il-mekkaniżmu ta' lissija fuq wiċċ l-injam mill-ilma frisk mhuwiex supponut li huwa l-istess fl-ghamla u s-severità tiegħu bħal-lissija minn wiċċ tal-injam mill-ilma baħar. B'hekk, għal prodotti jew tahlitiet ta' preservattivi tal-injam użati sabiex jittrattaw injam użat f'akwati tal-ilma baħar, hemm bżonn li jsir studju dwar il-lissija tal-injam għall-ilma baħar.
6. L-injam, fil-każ ta' injam ittrattat b'preservattiv tal-injam, għandu jkun jirrappreżenta l-injam użat b'mod kummerċjali. Għandu jiġi ttrattat skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur tal-preservattiv u b'konformità mal-istandards u l-ispeċifikazzjonijiet xierqa. Qabel ma jibda t-test għandhom jiġu ddikjarati l-parametri għall-kundizzjonament wara t-trattament tal-injam.
7. Il-kampjuni tal-injam użati għandhom ikunu jirrappreżentaw il-komoditajiet użati (eż., fir-rigward tal-ispeċijiet, id-densità u karatteristiċi oħrajn).

▼ M6

8. It-test jista' jiġi applikat għal injam bl-użu ta' proċess penetrattiv jew applikazzjoni superficjali jew għal injam ittrattat li għandu trattament tal-wiċċ obbligatorju addizzjonali (eż. zebgħa li hija applikata bħala rekwiżit għal użu kummerċjali).
9. Il-kompożizzjoni, l-ammont, il-pH u l-ghamla fizika tal-ilma huma importanti sabiex jiġu stabbiliti l-kwantità, il-kontenut u l-ghamla tal-emissjonijiet mill-injam.

PRINĊIPJU TAL-METODU TA' TTESTJAR

10. Il-kampjuni tat-test tal-injam ittrattat bil-preservattiv jitgħaddsu fl-ilma. L-ilma (emissat) jingabar u jiġi analizzat kimikament bosta drabi tul il-perjodu ta' espożizzjoni li jkun twil biżżejjed biex ikunu jistgħu jsiru kalkoli statistiċi. Ir-rati ta' emissjoni $\text{fmg/m}^2/\text{jum}$ huma kkalkolati mir-riżultati analitiċi. Il-perjodi ta' kampjunar għandhom jiġu rreġistrati. It-testijiet b'kampjuni mhux ittrattati għandhom jitwaqqfu jekk ma jkun hemm ebda sfond misjub fl-ewwel tliet punti ta' dejta.
11. L-inklużjoni ta' kampjuni tal-injam mhux ittrattat tippermetti li jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond għal emissati minn injam li mhumiex il-preservattiv użat.

KRITERJI TAL-KWALITÀ**Preċiżjoni**

12. Il-preċiżjoni tal-metodu ta' ttestjar biex tiġi stmata l-emissjoni tiddependi minn kemm il-kampjuni tat-test jirrapprezentaw l-injam ittrattat kummerċjalment, kemm l-ilma jirrapprezenta ilma veru u kemm ir-regim ta' espożizzjoni jirrapprezenta l-kundizzjonijiet naturali.
13. Il-preċiżjoni, ir-reqqa u r-ripetibilità tal-metodu analitiku għandhom jiġu stabbiliti qabel ma jsir it-test.

Riproduċibilità

14. Jingabru u jiġu analizzati tliet kampjuni ta' ilma u l-valur medju jittiehed bħala l-valur ta' emissjoni. Ir-riproduċibilità tar-riżultati fi f'dan laboratorju wiehied u bejn laboratorji differenti tiddependi mir-regim ta' tgħaddis u l-injam użat bħala kampjuni tat-test.

Medda Aċċettabbli tar-Riżultati

15. Medda tar-riżultati minn dan it-test li fiha l-valuri superjuri u inferjuri jvarjaw b'inqas minn ordni ta' manjitudni waħda hija aċċettabbli.

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST**Ilma**

16. Xenarji ta' lissija ta' ilma helu: Ilma dejonizzat (eż., ASTM D 1193 Tip II) huwa rrakkomandat sabiex jintuza fit-test tal-lissija meta jkun irid jiġi evalwat injam espost għal ilma helu. It-temperatura tal-ilma għandha tkun $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ u l-pH imkejla u t-temperatura tal-ilma jridu jkunu inklużi fir-rapport tat-test. Analizi tal-kampjuni tal-ilma użat meħudin qabel it-tgħaddis tal-kampjuni ttrattati tippermetti li jiġu stmata s-sustanzi kimiċi analizzati fl-ilma. Dan huwa kontroll sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond tas-sustanzi kimiċi li mbagħad jiġu analizzati kimikament.

▼ M6

17. Xenarji ta' lissija tal-ilma baħar: Ilma baħar sintetiku (eż., ASTM D 1141 Ilma tal-Oċean Sostitut mingħajr Metalli Tqal) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fit-test tal-lissija meta jkun irid jiġi evalwat injam espost għal ilma baħar. It-temperatura tal-ilma għandha tkun 20 °C +/- 2 °C u l-pH imkejla u t-temperatura tal-ilma jridu jkunu inklużi fir-rapport tat-test. Analizi tal-kampjuni tal-ilma użat meħudin qabel it-tgħaddis tal-kampjuni ttrattati tippermetti li jiġu stmati s-sustanzi kimiċi analizzati fl-ilma. Dan huwa kontrol għall-analizi tal-livelli ta' sfond għas-sustanzi kimiċi ta' importanza.

Kampjuni tat-Test tal-Injam

18. L-ispeċijiet tal-injam għandhom ikunu dawk tipiċi tal-ispeċijiet tal-injam użati għall-ittestjar tal-effikaċja tal-preservattivi tal-injam. L-ispeċijiet rrakkomandati huma *Pinus sylvestris* L. (arżnu tal-Iskozja), *Pinus resinosa* Ait. (arżnu aħmar) jew *Pinus spp* (arżnu tan-Nofsinhar). Jistgħu jsiru testijiet addizzjonali bl-użu ta' speċijiet oħrajn.
19. Għandu jintuża injam b'vina dritta mingħajr ingroppi. Għandu jiġi evitat materjal b'dehra reżinuża. L-injam għandu jkun injam tipiku disponibbli kummerċjalment. Għandhom jiġu rreġistrati s-sors, id-densità u n-numru ta' ċrieki annwali għal kull 10 mm.
20. Huwa rrakkomandat li l-kampjuni tat-test tal-injam ikunu settijiet ta' hamsa skont l-EN 113 blokko tad-daqs (dimensjonijiet ta' 25 mm × 50 mm × 15 mm) bin-naħat longitudinali paralleli għall-vina tal-injam, għad li jistgħu jintużaw dimensjonijiet oħrajn bħal 50 mm, b'150 mm, b'10 mm. Il-kampjun tat-test għandu jiġi għaddas kompletament fl-ilma. Il-kampjuni tat-test għandhom ikunu 100 % l-bieba taz-zokk tas-siġra. Kull kampjun jiġi mmarkat b'mod uniku sabiex ikun jista' jiġi identifikat matul it-test kollu.
21. Il-kampjuni kollha tat-test għandhom jiġu nċanati jew illixxati bis-serrieq u l-uċuh ma għandhomx jiġu mrammlin.
22. In-numru ta' settijiet ta' kampjuni tat-test tal-injam użati għall-analizi huwa tal-inqas hamsa: tliet settijiet ta' kampjuni jiġu ttrattati bil-preservattiv, sett ta' kampjuni ma jiġix ittrattat u sett ta' kampjuni sabiex jiġi stmat il-kontenut ta' umdità mnixxef bil-forn tal-kampjuni tat-test qabel it-trattament. Jiġi jekk b'żżejjed kampjuni tat-test sabiex ikunu jistgħu jingħazlu tliet settijiet ta' kampjuni li huma fi hda 5 % tal-valur medju tar-retenzjonijiet tal-preservattivi tal-grupp ta' kampjuni tat-test.
23. Il-kampjuni kollha tat-test huma ssiġillati fit-truf b'sustanza kimika li tevita milli l-preservattiv jippenetra fil-vina tat-tarf tal-kampjuni jew tevita lissija mill-kampjuni mill-vina tat-tarf. Hemm bżonn li ssir distinzjoni bejn kampjuni użati għall-applikazzjoni superficjali u l-proċessi ta' penetrazzjoni għall-applikazzjoni tas-siġillant tat-truf. L-applikazzjoni tas-siġillant tat-truf trid issir qabel it-trattament fil-każ ta' applikazzjoni superficjali biss.
24. Il-vina tat-truf trid tinfetħ għat-trattamenti permezz ta' proċessi ta' penetrazzjoni. Għalhekk, il-kampjuni jridu jiġu ssiġillati fit-truf fi tmiem il-perjodu ta' kundizzjonament. L-emissjoni trid tiġi stmata għan-naha tal-wiċċ longitudinali biss. Is-siġillanti għandhom jiġu spezzjonati u jerġgħu jiġu applikati jekk ikun hemm bżonn qabel ma tibda l-lissija u ma għandhomx jerġgħu jiġu applikati wara li tkun bdiet il-lissija.

▼ **M6****Kontenitur tat-Tghaddis**

25. Il-kontenitur huwa magħmul minn materjal inerti u huwa kbir biżżejjed biex ikun jifflaħ għal 5 kampjuni tal-injam EN113 f'500 ml ilma li jirriżultaw fi proporzjon ta' erja tas-superfċje għal volum tal-ilma ta' 0,4 cm²/ml.

Assemblaġġ tat-Test tal-Kampjuni

26. Il-kampjuni tat-test huma sostnuti fuq assemblaġġ li jippermetti sabiex l-uċuh esposti kollha tal-kampjun jidhlu f'kuntatt mal-ilma.

PROCEDURA GHAT-TRATTAMENT TA' PRESERVAZZJONI**Thejjija tal-Kampjuni tat-Test Ittrattati**

27. Il-kampjun tat-test tal-injam li ser jiġi ttrattat bil-preservattiv fit-test jiġi ttrattat bil-metodu speċifikat għall-preservattiv, li jista' jkun permezz ta' proċess ta' trattament b'penetrazzjoni jew proċessi ta' applikazzjoni superfċjali, li jista' jkun b'għodsa, sprejjar jew pinzellata.

Preservattivi li jiġu applikati bi proċess ta' trattament b'penetrazzjoni

28. Għandha tithejja soluzzjoni tal-preservattiv li tikseb it-tehid jew iż-żamma speċifikati meta jiġu applikati bl-użu tal-proċess ta' trattament b'penetrazzjoni. Il-kampjun tat-test tal-injam jintiżen u jitkejl d-daqsijiet tiegħu. Il-proċess ta' trattament b'penetrazzjoni għandu jiġi speċifikat għall-applikazzjoni tal-preservattiv għall-injam sabiex jintuża fil-Klassi tal-Użu 4 jew 5. Il-kampjun jerga' jintiżen wara t-trattament u r-retenzjoni tal-preservattiv (kg/m³) tiġi kkalkolata bl-ekwazzjoni:

$$\frac{\text{Massa wara t - trattament(kg)} - \text{Massa qabel it - trattament(kg)}}{\text{Volum tal - kampjun tat - test(m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Soluzzjoni Konċentrazzjoni(\% massa/massa)}}{100}$$

29. Kun af li f'dan it-test jista' jintuża injam ittrattat f'impjant tat-trattament industrijali (eż. b'mili bi pressjoni ta' vakwu). Il-proċeduri użati għandhom jiġu rreġistrati u r-retenzjoni tal-materjal ittrattat b'dan il-mod għandha tiġi analizzata u rreġistrata.

Preservattivi li jiġu applikati bi proċessi ta' applikazzjoni superfċjali

30. Il-proċess ta' applikazzjoni superfċjali jinkludi għodsa, sprejjar jew pinzellata tal-kampjuni tat-test tal-injam. Il-proċess u r-rata ta' applikazzjoni (eż. litri/m²) għandhom ikunu kif speċifikat għall-applikazzjoni superfċjali tal-preservattiv.

31. Kun af ukoll li f'dan il-każ jista' jintuża injam ittrattat f'impjant tat-trattament industrijali. Il-proċeduri użati għandhom jiġu rreġistrati u r-retenzjoni tal-materjal ittrattat b'dan il-mod trid tiġi analizzata u rreġistrata.

Kondizzjonament tal-Kampjuni tat-Test wara t-Trattament

32. Wara t-trattament, il-kampjuni tat-test ittrattati għandhom jiġu kondizzjonati skont ir-rakkomandazzjonijiet magħmulin mill-fornitur tal-preservattiv tat-test skont ir-rekwiziti tat-tikketta tal-preservattiv jew b'konformità mal-prattiki tat-trattament kummerċjali jew skont l-Istandard EN 252.

▼ **M6****Thejjija u Għażla tal-Kampjuni tat-Test**

33. Wara l-kondizzjonament ta' wara t-trattament, ir-retenzjoni medja tal-grupp tal-kampjuni tat-test tiġi kkalkolata u jingħażlu għal għarrieda tliet settijiet rappreżentattivi tal-kampjuni b'retenzjoni li tkun fi hdan 5 % mill-medja għall-grupp sabiex titkejjel il-lissija.

PROCEDURA GHALL-KEJLIET TAL-EMISSIONI TAL-PRESERVATIVI**Metodu ta' Immersjoni**

34. Il-kampjuni tat-test jintiżnu u wara jitgħaddsu kompletament fl-ilma u jiġu rreġistrati d-data u l-hin. Il-kontenitur jitgħatta biex tonqos l-evaporazzjoni.
35. L-ilma jinbidel kull ċertu żmien li ġej: 6 sigħat, jum, jumejn, 4 ijiem, 8 ijiem, 15-il jum, 22 jum, 29 jum (nota: dawn huma l-hinijiet/żminijiet totali mhux il-hinijiet/żminijiet ta' intervall). Għandhom jiġu rreġistrati ż-żmien u d-data tal-bidla tal-ilma u l-massa tal-ilma rkuprata mill-kontenitur.
36. Wara kull bidla tal-ilma, jinżamm kampjun tal-ilma li fih tgħaddas is-sett ta' kampjuni tat-test sabiex imbagħad tkun tista' ssir analiżi kimika.
37. Il-proċedura ta' kampjunar tippermetti li jiġi kkalkolat il-profil tal-kwantità tal-emissjonijiet kontra ż-żmien. Il-kampjuni għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet li jippreservaw l-analit, eż., fi friġġ fid-dlam biex jonqos it-tkabbir ta' mikrobi fil-kampjun qabel l-analiżi.

KEJLIET TAL-EMISSIONIJIET**Kampjuni Ttrattati**

38. L-ilma miġbur jiġu analizzat kimikament għas-sustanza attiva u/jew il-prodotti rilevanti ta' degradazzjoni/trasformazzjoni, jekk ikun xieraq.

Kampjuni Mhux Ittrattati

39. Il-ġbir tal-ilma (emissat) f'din is-sistema u l-analiżi sussegwenti tas-sustanzi kimiċi li ġew lixxivjati mill-kampjuni ta' injam mhux ittrattati jippermetti sabiex tiġi stmata r-rata possibbli ta' emissjoni tal-preservattiv mill-injam mhux ittrattat. Il-ġbir u l-analiżi tal-emissat wara perjodi ta' żmien dejjem itwal jippermettu sabiex tiġi stmata r-rata ta' bidla tar-rata ta' emissjoni maż-żmien. Din l-analiżi hija proċedura tal-kontroll sabiex jiġu stabbiliti l-livelli ta' sfond tas-sustanza kimika tat-test f'injam mhux ittrattat sabiex jiġi kkonfermat li l-injam użat bħala sors tal-kampjuni ma jkunx ġie ttrattat minn qabel bil-preservattiv.

DEJTA U RAPPORTAR**Analiżijiet Kimiċi**

40. L-ilma miġbur jiġi analizzat kimikament u r-risultat tal-analiżi tal-ilma tingħata f'unitajiet xierqa, eż., µg/l.

Rapportar tad-Dejta

41. Jiġu rreġistrati r-risultati kollha. L-Appendiċi juri eżempju ta' formola ta' reġistrazzjoni ssuġġerita għal sett wiehed ta' kampjuni tat-test ittrattati, u t-tabella sommarju sabiex jiġu kkalkolati l-valuri medji ta' emissjoni tul kull intervall tal-kampjunar.
42. Il-fluss ta' emissjoni ta' kuljum $f_{mg/m^2/jum}$ jiġi kkalkolat bit-tehid tal-medja tat-tliet kejljet mit-tliet irreprikati u d-diviżjoni bin-numru ta' jiem tat-tgħaddis.

▼ **M6****Rapport tat-Test**

43. Tal-inqas ghandha tigi pprovduta l-informazzjoni li ġeja fir-rapport tat-test:

- Isem il-fornitur tal-preservattiv attwalment ittestjat;
- L-isem jew il-kodiċi speċifiku u uniku tal-preservattiv ittestjat;
- L-isem kummerċjali jew komuni tal-ingredjent(i) attiv(i) b'deskrizzjoni generika tal-koformulanti (eż. kosolvent, reżina), u l-kompożizzjoni f' % m/m tal-ingredjenti;
- Ir-retenzjoni jew it-taghbija relevanti (f'kg/m^3 jew l/m^2 , rispettivament) speċifikati għall-injam użat f'kuntatt mal-ilma;
- L-ispeċi ta' injam użata, bid-densità tagħha u r-rata ta' tkabbir fi ċrieki kull 10 mm;
- It-taghbija jew ir-retenzjoni tal-preservattiv ittestjat u l-formula użata sabiex tigi kkalkolata r-retenzjoni, moghtija bħala l/m^2 jew kg/m^3 ;
- Il-metodu ta' applikazzjoni tal-preservattiv, li jispeċifika l-iskeda tat-trattament użata għal proċess ta' penetrazzjoni, u l-metodu ta' applikazzjoni jekk intuża trattament superfiċjali;
- Id-data ta' applikazzjoni tal-preservattiv, u stima tal-kontenut ta' umdità tal-kampjuni tat-test, moghtijin bħala perċentwal;
- Il-proċeduri ta' kondizzjonament użati, billi jiġu speċifikati t-tip, il-kundizzjonijiet u d-durata;
- Speċifikazzjoni tas-sigillant tat-truf użat u kemm-il darba ġie applikat;
- Speċifikazzjoni ta' kwalunkwe trattament sussegwenti tal-injam, eż. speċifikazzjoni tal-fornitur, it-tip, il-karatteristiċi u t-taghbija ta' żebgħa;
- Il-hin u d-data ta' kull avveniment ta' tghaddis, l-ammont ta' ilma użat għat-tghaddis tal-kampjuni tat-test f'kull avveniment, u l-ammont ta' ilma assorbit mill-injam matul l-ghodsa;
- Kwalunkwe varjazzjoni mill-metodu deskritt u kwalunkwe fattur li seta' influwenza r-riżultati.

LETTERATURA

- (1) European Standard, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- (2) European Standard, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- (3) European Standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) European Standard, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part1: General.
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
- (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼ **M6***Appendiċi I***Formola ta' reġistrazzjoni għall-metodu ta' ttestjar**

Stima ta' Emissjonijiet mill-Injam Ittrattat bil-Preservattiv fl-Ambjent: Metodu tal-Laboratorju għall-Komoditajiet tal-Injam li mhumiex Koperti u li huma f'Kuntatt ma' Ilma Helu jew Ilma Bahar

Laboratorju tat-test	
Preservattiv tal-injam	
Il-fornitur tal-preservattiv	
L-isem jew il-kodiċi speċifiku u uniku tal-preservattiv	
L-isem kummerċjali jew komuni tal-preservattiv	
Il-koformulanti	
Ir-retenzjoni relevanti għall-injam użat f'kuntatt mal-ilma	
Applikazzjoni	
Il-metodu ta' applikazzjoni	
Id-data ta' applikazzjoni	
Il-formula użata biex tiġi kkalkolata r-retenzjoni:	
Il-proċedura ta' kondizzjonament	
Id-durata tal-kondizzjonament	
Is-sigillant tat-truf / kemm-il darba ġie applikat	
It-trattament sussegwenti	jekk relevanti
Kampjuni tat-test	
Speċijiet ta' injam	
Densità tal-injam	(minimu ... valur medju ... massimu)
Rata ta' tkabbir (ċrieki għal kull 10 mm)	(minimu ... valur medju ... massimu)
Kontenut ta' umdità	

▼ **M6**

Assemblaġġi tat-test (*)	Retenzjoni (eż. kg/m³)
Ittrattat “x”	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Ittrattat “y”	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Ittrattat “z”	Valur medju u devjazzjoni standard jew medda għal 5 kampjuni
Mhux ittrattat	
Varjazzjoni tal-parametri tal-metodu ta' ttestjar	eż. kwalità tal-ilma, dimensjoni tal-kampjuni tat-test eċċ.
(*) x, y, z jirrappreżentaw it-tliet kampjuni tal-irreplikati	

▼ **M6**

Żmien	Bidla tal- ima	Massa tal-kampjun		Tehid ta' ilma		Kampjun ta' ilma				
		Ittrattat (medju)	Mhux ittrattat	Ittrattat (medju)	Mhux ittrattat		Ilma tat-test	x	y	z
	Data	g	g	g	g	nru	pH	pH	pH	pH
bidu										
6 sığhat						1				
24 siegħa						2				
jumejn						3				
4 j						4				
8 j						5				
15-il j						6				
22 j						7				
29 j						8				

▼ **M6**

Jekk jogħbok hejji tabelli separati għal kull ingredjent attiv

Żmien	Bidla tal-Ilma	Riżultati Analitiċi														
		Kampjuni Mhux Itrattati			Kampjuni Ttrattati											
		Konċentraz- zjoni a.i fl- ilma mg/l	Kwantità emessa mg/m ²	Rata ta' emissjoni mg/m ² /jum	Konċentrazzjoni a.i. fl-ilma				Kwantità emessa				Rata ta' emissjoni			
	x				y	z	Medja	x	y	z	Medja	x	y	z	Medja	
	Data				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d
6 sghat																
24 siegħa																
jumejn																
4 j																
8 j																
15-il j																
22 j																
29 j																

Nota: Peress li r-riżultati mill-kampjuni mhux ittrattati ja' ikollhom jintużaw sabiex jiġu korretti r-rati ta' emissjoni mill-kampjuni mhux, ir-riżultati tal-mhux ittrattati għandhom jiġu l-ewwel u l-valuri kollha għall-kampjuni ttrattati jkunu "valuri korretti". Jista' jkun hemm ukoll korrezzjoni għall-analiżi tal-ilma inizjali.

▼ **M6**

Appendiċi 2

Definizzjonijiet

Sustanza kimika: Sustanza jew tahlita.

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

▼ M6

C.46. BIJOAKKUMULAZZJONI F'OLIGOĊAETI BENTIĊI LI JGHIXU FIN-NAQAL**INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida ta' ttestjar (TG) 315 tal-OECD (2008) Annimali endobentiċi li jingestu n-naqal jistgħu jkunu esposti għal sustanzi maqbudin fin-naqal (1). Fost dawn l-ingesturi tan-naqal, l-oligoċaeti akkwatiċi għandhom rwol importanti fil-qighan tas-sistemi akkwatiċi. Jghixu fin-naqal u spiss jirrappreżentaw l-iktar speċijiet abbundanti, speċjalment f'habitats b'kundizzjonijiet ambjentali avversi għal annimali oħrajn. Minhabba l-bijoturbazzjoni tan-naqal u peress li jservu ta' priża, dawn l-annimali jista' jkollhom influwenza kbira fuq il-bijodisponibilità tat-tali sustanzi għal organiżi oħrajn, eż. hut bentivoruż. Għall-kuntrarju ta' organiżmi epibentiċi, l-oligoċaeti akkwatiċi endobentiċi jhaffru fin-naqal, u jingestu partikoli tan-naqal taħt il-wiċċ tan-naqal. Għalhekk, dawn l-organiżmi huma esposti għal sustanzi permezz ta' hafna rotot ta' tehid, inklużi kuntatt dirett, l-ingestjoni ta' partikoli kontaminati tan-naqal, ilma tal-pori u ilma tal-madwar. Ċerti speċijiet ta' oligoċaeti bentiċi li bħalissa jintużaw fl-ittestjar ekotossikologiku huma deskritti fl-Appendiċi 6.
2. Il-parametri li jikkarakterizzaw il-bijoakkumulazzjoni ta' sustanza jinkludu l-ewwel u qabel kollox il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF), il-kostanti tar-rata ta' tehid tan-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e). Id-definizzjonijiet iddettalja ta' dawn il-parametri huma pprovduti fl-Appendiċi 1.
3. Biex tivvaluta l-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi iġenerali, u biex tinvestiga l-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li għandhom tendenza jinqasnu fin-naqal jew fuqu, huwa meħtieġ metodu ta' ttestjar speċifiku għall-kompartiment (1)(2)(3)(4).
4. Il-metodu ta' ttestjar huwa mfassal sabiex tiġi vvalutata l-bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi assoċjati man-naqal f'dud oligoċaet endobentiku. Is-sustanza tat-test hija miżjuda fin-naqal. L-użu ta' naqal miżjud huwa maħsub sabiex jissimula naqal ikkontaminat.
5. Dan il-metodu huwa bbażat fuq il-metodi eżistenti ta' ttestjar tat-tossiċità u l-bijoakkumulazzjoni tan-naqal (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Dokumenti siewja oħrajn huma: id-diskussjonijiet u r-riżultati ta' sessjoni ta' hídma internazzjonali (11), u l-eżitu ta' ringtest internazzjonali (12).
6. Dan it-test japplika għal sustanzi organiċi stabbli u newtrali, li għandhom tendenza li jaqdbu man-naqal. Il-bijoakkumulazzjoni ta' komposti metalorganiċi stabbli li jaqdbu man-naqal tista' titkejjel b'dan il-metodu wkoll (12). Mhuwiex applikabbli għal metalli u elementi traċċa oħrajn (11) bla modifika tad-disinn tat-test fir-rigward tas-sustrat u l-volumi ta' ilma, u possibilmént id-daqs tal-kampjun tat-tessut.

PREREKWIŻIT U INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA TAT-TEST

7. Bħalissa hemm disponibbli biss flit Relazzjonijiet Kwantitattivi stabbiliti sew bejn l-Istruttura u l-Attività (QSAR) rigward il-proċessi ta' bijoakkumulazzjoni (14). L-iktar relazzjoni użata b'mod komuni hija l-korrelazzjoni bejn il-bijoakkumulazzjoni u l-bijokonċentrazzjoni ta' sustanzi organiċi stabbli u l-lipofilicità tagħhom (mogħtija bħala l-logaritma tal-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma ($\log K_{ow}$); ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni), rispettivament, li giet żviluppata għad-deskrizzjoni ta' sustanza b'partizzjoni bejn l-ilma u l-hut. Korrelazzjonijiet għall-kompartiment tan-naqal ġew stabbiliti bl-użu ta'

▼ **M6**

din ir-relazzjoni wkoll (15)(16)(17)(18). Il-korrelazzjoni log K_{ow} -log tal-BCF bhala QSAR principali tista' tkun siewja għall-ewwel stima preliminari tal-potenzjal ta' bijoakkumulazzjoni tas-sustanzi li jaqdbu man-naqal. Madankollu, il-BAF jista' jkun influwenzat minn kontenut lipidu tal-organizmu tat-test u l-kontenut ta' karbonju organiku tan-naqal. Għalhekk, il-koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju/ilma (K_{oc}) jista' jintuża wkoll bhala determinant importanti tal-bioakkumulazzjoni tas-sustanzi organiċi assoċjati man-naqal.

8. Dan it-test huwa applikabbli għal:

- sustanzi stabbli u organiċi b'valuri tal-log K_{ow} ta' bejn 3,0 u 6,0 (5)(19) u sustanzi superlipofiliċi li juru log K_{ow} ta' iktar minn 6,0 (5);
- sustanzi li jappartjenu għal klassi ta' sustanzi organiċi magħrufin għall-potenzjal ta' bioakkumulazzjoni tagħhom f'organizmi ħajjin, eż. tensjoattivi jew sustanzi ferm assorbenti (eż. K_{oc} għoli).

9. L-informazzjoni dwar is-sustanza tat-test, bħal prekawzjonijiet tas-sikurezza, kundizzjonijiet u stabbiltà xierqa tal-ħżin, u metodi analitiċi għandha tinkiseb qabel jinbeda l-istudju. Għidha għall-ittestjar ta' sustanzi bi karatteristiċi fiżi-kokimiċi li jagħmluha diffiċli sabiex jiġu ttestjati hija pprovduta f'(20) u (21). Qabel ma jsir test għall-bioakkumulazzjoni b'oligoċaeti, għandha tkun magħrufa l-informazzjoni li ġejja dwar is-sustanza tat-test:

- l-isem komuni, isem is-sustanza kimika (ideament l-isem tal-IUPAC), il-formula strutturali, in-numru tar-reġistru tas-CAS, il-purità;
- is-solubilità fl-ilma [metodu ta' ttestjar A.6 (22)];
- il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma, K_{ow} [il-metodi ta' ttestjar A.8, A.24 (22)];
- il-koeffiċjent ta' partizzjoni ilma/naqal, mogħti bhala K_d jew K_{oc} [metodu ta' ttestjar C.19 (22)];
- idrolizi [metodu ta' ttestjar C.7 (22)];
- fototrasformazzjoni fl-ilma (23);
- pressjoni tal-fwar [metodu ta' ttestjar A.4 (22)];
- bijodegradabilità lesta [metodi ta' ttestjar C.4 u C.29 (22)];
- tensjoni tas-superfiċje [metodu ta' ttestjar A.5 (22)];
- konċentrazzjoni kritika ta' micelli (24).

Barra minn hekk, l-informazzjoni li ġejja — meta tkun disponibbli — tkun relevanti:

- il-bijodegradazzjoni fl-ambjent akkwatiku [metodi ta' ttestjar C.24 u C.25 (22)];
- il-kostanti tal-liġi ta' Henry.

10. Sustanzi tat-test radjotikkettati jistgħu jhaffu l-analizi tal-kampjuni ta' ilma, naqal u bijologiċi, u jistgħu jintużaw sabiex jiġi stabbilit jekk għandhomx jiġu identifikati u kkwantifikati l-prodotti ta' degradazzjoni. Il-metodu deskritt hawnhekk ġie vvalidat f'ringtest internazzjonali (12) għal sustanzi ttikkettati ^{14}C . Jekk jitkejlu r-residwi radjuattivi totali, il-fattur ta' bioakkumulazzjoni (BAF) ikun ibbażat fuq is-sustanza prinċipali inkluż kwalunkwe prodott ta' degradazzjoni miżmum. Huwa possibbli wkoll li studju dwar il-metabolizmu jitgħaqqaq flimkien ma' studju dwar il-bioakkumulazzjoni b'analizi u kwantifikazzjoni tal-perċentwal ta' sustanza prinċipali u l-prodotti

▼ M6

ta' degradazzjoni tagħha f'kampjuni meħudin fi tmiem il-fażi ta' teħid jew fl-oghla livell ta' bjoakkumulazzjoni. Xorta wahda dejjem huwa rrakkomandat li l-kalkolu tal-BAF ikun ibbażat fuq il-koncentrazzjoni tas-sustanza prinċipali fl-organizmu u mhux biss fuq residwi radjuattivi totali.

11. Minbarra l-karatteristiċi tas-sustanza tat-test, informazzjoni oħra li hija meħtieġa hija t-tossiċità għall-ispeċijiet oloġoċaeti li għandhom jintużaw fit-test, bħal konċentrazzjoni letali medjana (LC_{50}) għall-perjodu meħtieġ għall-fażi tat-teħid, sabiex jiġi żgurat li l-konċentrazzjonijiet ta' espożizzjoni magħżulin huma ferm inqas mil-livelli tossiċi. Jekk disponibbli, għandha tingħata preferenza lil valuri tat-tossiċità miġjubin minn studji fit-tul fuq punti ta' tmiem subletali (EC_{50}). Jekk it-tali dejta ma tkunx disponibbli, test dwar it-tossiċità akuta fl-istess kundizzjonijiet bħall-kundizzjonijiet tat-test tal-bjoakkumulazzjoni, jew dejta dwar it-tossiċità fuq dejta ta' speċijiet surrogati oħrajn jistgħu jipprovdi informazzjoni siewja.
12. Irid ikun disponibbli metodu analitiku xieraq bi preċiżjoni, reqqa u sensittività magħrufin sabiex jikkwantifika s-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, fin-naqal u fil-materjal bijoloġiku, flimkien ma' dettalji tat-thejija u l-ħżin tal-kampjun kif ukoll l-iskedi ta' dejta ta' sigurtà tal-materjali. Għandhom ikunu magħrufin ukoll il-limiti ta' detezzjoni analitika tas-sustanza tat-test fl-ilma, in-naqal u t-tessut tad-dud. Jekk tintuża sustanza tat-test radjuttikkettata, ir-radjuattività speċifika (jiġifieri $Bq\ mol^{-1}$), il-pożizzjoni tal-atomu radjuttikkettat, u l-perċentwal ta' radjuattività assoċjat mal-impuritajiet iridu jkunu magħrufin ukoll. Ir-radjuattività speċifika tas-sustanza tat-test għandha tkun għolja kemm jista' jkun sabiex jinstabu l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test possibbli (11).
13. Għandha tkun disponibbli informazzjoni dwar il-karatteristiċi tan-naqal li ser jintuża (eż. l-origini tan-naqal jew il-kostitwenti tiegħu, il-pH u l-koncentrazzjoni ta' ammonijaka tal-ilma tal-pori (naqal tal-ghelieqi), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal) (6).

PRINĊIPJU TAT-TEST

14. It-test jikkonsisti f'żewġ fażijiet; il-fażi ta' teħid (espożizzjoni) u l-fażi ta' eliminazzjoni (wara l-espożizzjoni). Matul il-fażi tat-teħid, id-dud jiġi espost għan-naqal miżjud bis-sustanza tat-test, flimkien ma' ilma rikostitwit u ekwilibrat kif xieraq (11). Il-gruppi tad-dud tal-kontroll jinżammu fl-istess kundizzjonijiet mingħajr is-sustanza tat-test.
15. Għall-fażi tal-eliminazzjoni, id-dud jiġi ttrasferit f'sistema ta' naqal u ilma hielsa mis-sustanza tat-test. Fażi ta' eliminazzjoni hija neċessarja biex tinkiseb informazzjoni dwar ir-rata li biha s-sustanza tat-test titneħħa mill-organizmu tat-test (19)(25). Fażi ta' eliminazzjoni dejjem tkun meħtieġa sakemm it-teħid tas-sustanza tat-test matul il-fażi ta' espożizzjoni ma jkunx insinifikanti (eż. ma jkun hemm ebda differenza statistika bejn il-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud tat-test u tal-kontroll). Jekk ma jkunx inkiseb stat kostanti matul il-fażi tat-teħid, id-determinazzjoni tal-kinetika — il-kostanti tal- BAF_K , it-teħid u r-rata ta' eliminazzjoni — tista' ssir bl-użu tar-riżultati tal-fażi ta' eliminazzjoni. Bidla fil-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud/fuqhom tiġi ssorveljata matul iż-żewġ fażijiet tat-test.
16. Matul il-fażi tat-teħid, isiru kejljet sakemm il-BAF ikun lahaq plateau jew stat kostanti. Is-soltu, it-tul tal-fażi tat-teħid għandu jkun ta' 28 jum. L-esperjenza fil-prattika wriet li fażi ta' teħid ta' bejn 12 u 14-il jum hija biżżejjed sabiex bosta sustanzi organiċi newtrali stabbli jilhqqu stat kostanti (6)(8)(9).

▼ M6

17. Madankollu, jekk l-istat kostanti ma jintlahaqx sal-jum 28, il-faži ta' eliminazzjoni tinbada bit-trasferiment tal-oligoċaeti esposti fir-recipienti li fihom l-istess midjum minghajr is-sustanza tat-test. Il-faži ta' eliminazzjoni tintemm meta jew jintlahaq il-livell ta' 10 % tal-konċentrazzjoni mkejla fid-dud fil-jum 28 tal-faži ta' tehid, jew inkella wara tul massimu ta' 10 ijiem. Il-livell residwu fid-dud fi tmiem il-faži ta' eliminazzjoni jiġi rrapportat bħala punt ta' tmiem addizzjonali, eż. bħala Residwi mhux eliminati (NER). Il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF_{ss}) huwa kkalkolat idealment kemm bħala l-proporzjon ta' konċentrazzjoni f'dud (C_a) kif ukoll fin-naqal (C_s) fi stat li jidher kostanti, u bħala fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika, BAF_K bħala l-proporzjon tal-kostanti tar-rata ta' tehid min-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) jekk tiġi supponuta kinetika tal-ewwel ordni. Jekk ma jintlahaqx stat kostanti fi żmien 28 jum, ikkalkola l- BAF_K mill-kostanti tar-rata ta' tehid u dak tar-rata ta' eliminazzjoni. Għall-kalkolu ara l-Appendiċi 2. Jekk ma tkunx applikabbli kinetika tal-ewwel ordni, għandhom jithaddmu mudelli iktar kumplessi Appendiċi 2 u referenza (25).
18. Jekk ma jinkisibx stadju kostanti fi żmien 28 jum, il-faži tat-tehid tista' tiġi estiza billi l-gruppi ta' dud espost — jekk possibbli — jiġu soġġetti għal iktar kejl sakemm jintlahaq l-istat kostanti; b'mod parallel, il-faži ta' tneh-hija xorta wahda għandha tinbada fil-jum 28 tal-faži ta' tehid.
19. Il-kostanti tar-rata ta' tehid, il-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (jew bosta kostanti, meta jkunu involuti mudelli iktar kumplessi), il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K) u, fejn possibbli, il-limiti ta' kunfidenza ta' kull wiehed minn dawn il-parametri huma kkalkolati minn ekwazzjonijiet b'mudell kompjuterizzati (ara l-Appendiċi 2 għall-mudelli). Kemm kwalunkwe mudell ikun xieraq jista' jiġi stabbilit mill-koeffiċjent ta' korrelazzjoni jew il-koeffiċjent ta' determinazzjoni (koeffiċjenti qrib 1 jindikaw idoneità).
20. Biex tonqos il-varjabbiltà fir-riżultati tat-test għal sustanzi organiċi b'lipofili-tà għolja, il-fatturi tal-bioakkumulazzjoni għandhom jingħataw ukoll b'raba mal-kontenut lipidu tal-organizmi tat-test u l-kontenut ta' karbonju organiku (TOC) fin-naqal (fattur ta' akumulazzjoni ta' bijota-naqal jew BSAF f'kg TOC tan-naqal kg^{-1} ta' kontenut lipidu tad-dud). Dan l-approċċ huwa bbażat fuq esperjenzi u korrelazzjonijiet teorici għall-kompartiment akkwatiku, fejn — għal certi klassijiet ta' sustanzi kimiċi — hemm relazzjoni ċara bejn il-potenzjal li sustanza tibbjoakkumula u l-lipofili-tà tagħha, li giet stabbilita sew għall-hut bħala organizmi mudell (14)(25)(27). Hemm anki relazzjoni bejn il-kontenut lipidu tal-hut tat-test u l-bioakkumulazzjoni osservata tat-tali sustanzi. Għal organizmi bentiċi, instabu korrelazzjonijiet simili (15)(16)(17)(18). Jekk hemm biżżejjed tessut tad-dud disponibbli, il-kontenut lipidu tal-annimali tat-test jista' jiġi stabbilit fuq l-istess materjal bijoloġiku bħal dak użat sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test. Madankollu, huwa Prattiku li jintużaw annimali tal-kontroll imdor-rijin, tal-inqas fil-bidu, jew — idealment — fl-aħħar tal-faži tat-tehid sabiex jitkejjel il-kontenut lipidu, li mbagħad jista' jintuża biex jiġu normalizzati l-valuri tal-BAF.

VALIDITÀ TAT-TEST

21. Sabiex test ikun validu japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:

— Il-mortalità kumulattiva tad-dud (kontrolli u trattamenti) sa tmiem it-test ma għandhiex taqbez l-20 % tan-numru inizjali.

— Barra minn hekk, għandu jintwera li d-dud iħaffer fin-naqal sabiex jiġi espost sal-livell massimu. Għad-dettalji ara l-paragrafu 28.

▼ **M6****DESKRIZZJONI TAL-METODU****Speċijiet tat-test**

22. Għat-test jistgħu jintużaw bosta speċijiet ta' oligoċaeti akkwatiċi. L-iktar speċijiet użati spiss huma elenkati fl-Appendiċi 6.
23. It-testijiet tat-tossicità (96 siegħa, fl-ilma biss) għandhom isiru f'intervalli regolari (eż. kull xahar) b'tossikant ta' referenza bħall-klorur tal-potassju (KCl) jew sulfat tar-ram (CuSO_4) (1) sabiex jintwerew il-kundizzjonijiet tas-saħħa tal-annimali tat-test (1)(6). Jekk it-testijiet tat-tossicità ta' referenza ma jsirux kull ċertu żmien, il-lott tal-organizmi li għandhom jintużaw f'test tal-bijoakkumulazzjoni tan-naqal għandu jiġi vverifikat bl-użu ta' tossikant ta' referenza. Il-kejl tal-kontenut lipidu jista' jservi wkoll ta' informazzjoni siewja dwar il-kundizzjoni tal-annimali.

Koltura tal-organizmi tat-test

24. Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' dud għat-twettiq ta' testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, id-dud jaf ikollu jinżamm f'koltura tal-laboratorju permanenti ta' speċi waħda. Il-metodi tal-koltura tal-laboratorju għall-ispeċi magħżula tat-test huma spjegati fil-qosor fl-Appendiċi 6. Għad-dettalji ara r-referenzi (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Apparat

25. Ara li tevita milli tuża materjali għall-partijiet kollha tat-tagħmir li jistgħu jinħallu, jassorbu sustanzi tat-test jew inixxu sustanzi oħrajn u għandhom effett avvers fuq l-annimali tat-test. Il-kompartimenti rettangolari jew ċilindriċi standard, magħmulin minn materjal kimikament inerti u b'kapaċità xierqa f'konformità mar-rata ta' tagħbija, jiġifieri jista' jintuża n-numru ta' dud tat-test. Għandu jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik rotob għall-ghoti tal-ilma jew l-arja. Għandhom jintużaw politetrafluoroetilen, azzar inossidabbli u/jew hġieg għal kwalunkwe tagħmir li jidhol f'kontatt mal-midjums tat-test. Għal sustanzi b'koefiċjenti ta' assorbiment għoljin, bħal piretrojdi sintetiċi, jaf ikun meħtieġ hġieg silanizzat. F'dawn is-sitwazzjonijiet, it-tagħmir ikollu jintrema wara li jintuża (5). Għal sustanzi tat-test radjutikkettati, u għal sustanzi volatili, għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi evitat strippaġġ u l-hruġ ta' sustanza tat-test strippata. Għandhom jintużaw nases (eż. fliexken tal-ħasil tal-gass tal-hġieg) li fihom assorbimenti xierqa biex iżommu kwalunkwe residwu li jevapora mill-kompartimenti tat-test (11).

Ilma

26. L-ilma tal-madwar irid ikun ta' kwalità li tippermetti li l-ispeċijiet tat-test jibqgħu hajjin matul il-perjodi ta' akklimazzjoni u tat-test bla ma juru xi dehra jew imġiba anormali. Ilma rikostitwit skont il-metodu ta' ttestjar C.1 (25) huwa rrakkomandat sabiex jintuża bħala ilma tal-madwar fit-testijiet kif ukoll fil-kolturi tal-laboratorju tad-dud. Intwera li bosta speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu hajjin, jikbru, u jirriproduċu f'dan l-ilma (8), u hija pprovduta standardizzazzjoni massima tal-kundizzjonijiet tat-test u tal-koltura. L-ilma għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-pH, il-konduttività u l-ebusija. L-analiżi tal-ilma għal mikroinkwinanti qabel l-użu tista' tipprovdi informazzjoni siewja (Appendiċi 4).
27. L-ilma għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu ta' test. Il-pH tal-ilma tal-madwar għandha tkun ta' bejn 6 u 9. L-ebusija totali għandha tkun ta' bejn 90 u 400 mg CaCO_3 għal kull litru fil-bidu tat-test (7). Il-meded għall-pH u l-ebusija fl-ilma rikostitwit imsemmi jingħataw fil-metodu ta' ttestjar C.1 (25). Jekk hemm suspett ta' interazzjoni bejn il-joni tal-ebusija

▼ M6

u s-sustanza tat-test, għandu jintuża l-ilma bl-inqas ebusija. L-Appendiċi 4 jiġbor fil-qosor il-kriterji addizzjonali ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli skont it-TG 210 tal-OECD (34).

Naqal

28. In-naqal irid ikun ta' kwalità li tippermetti s-sopravivenza u, idealment, ir-riproduzzjoni tal-organizmi tat-test sad-durata tal-perjodi tad-drawwa u t-test bla ma juru xi dehra jew imġiba anormali. Id-dud għandu jhaffer fin-naqal. L-imġiba ta' thaffir jista' jkollha influwenza fuq l-espożizzjoni, u konsegwentement fuq il-BAF. Għalhekk, imġiba ta' evitar jew thaffir tan-naqal mill-organizmi tat-test għandha tiġi rreġistrata, meta ċ-ċarezza tal-ilma tal-madwar tippermetti li jsiru osservazzjonijiet bħal dawn. Id-dud (kontroll u trattamenti) għandu jhaffer fin-naqal fi hdan perjodu ta' 24 siegħa minn meta jiddaħħal fir-reċipjenti tat-test. Jekk jiġi osservat nuqqas ta' thaffir jew evitar tan-naqal b'mod permanenti (eż. iktar minn 20 % tul iktar minn nofs il-fażi tat-tehid), dan jindika li jew il-kundizzjonijiet tat-test mhumix xierqa, jew inkella l-organizmi tat-test mhumix b'saħħithom, jew li l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test tikkaguna din l-imġiba. F'dan il-każ, it-test għandu jitwaqqaf u jerga' jsir f'kundizzjonijiet aħjar. Informazzjoni addizzjonali dwar l-ingestjoni tan-naqal tista' tinkiseb bl-użu tal-metodi deskritti f'(35)(36), li jispeċifikaw l-ingestjoni tan-naqal jew l-għażla tal-partikoli fl-organizmi tat-test. Jekk osservabbli, tal-inqas il-preżenza jew l-assenza ta' gerbub tar-rawt fuq il-wiċċ tan-naqal, li jindikaw ingestjoni tan-naqal mid-dud, trid tiġi rreġistrata u kkunsidrata fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test fir-rigward tal-passaġġi ta' espożizzjoni.

29. Naqal artifiċjali bbażat fuq il-hamrija artifiċjali deskritta fil-metodu ta' ttestjar C.8 (40) huwa rrakkomandat sabiex jintuża fiż-żewġ testijiet u fil-kolturi tal-laboratorju tad-dud (Appendiċi 5), peress li naqal naturali ta' kwalità xierqa jaf ma jkunx disponibbli tul is-sena. Barra minn hekk, l-organizmi indigeni kif ukoll il-preżenza possibbli ta' mikroinkwinanti f'naqal naturali jistgħu jinfluwenzaw it-test. Bosta speċijiet tat-test jistgħu jibqgħu hajjin, jikbru u jirriproduċu fin-naqal artifiċjali (8).

30. In-naqal artifiċjali għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-orijini tal-kostituenti, id-distribuzzjoni tad-daqs tal-hbub (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), il-kontenut ta' ilma, u l-pH. Il-kejl tal-potenzjal ta' redox mhuwix obligatorju. Madankollu, naqal naturali minn siti mhux immiġġsin jista' jservi bħala naqal tat-test u/jew tal-koltura (1). Naqal naturali għandu jkun ikkaratterizzat tal-inqas mill-orijini (sit ta' ġbir), il-pH u l-ammonijaka tal-ilma tal-pori, il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal) u l-kontenut perċentwali ta' ilma (6). Huwa rrakkomandat li, qabel jiġi ddied bis-sustanza tat-test, in-naqal naturali jiġi kondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li huma prevalenti fit-test sussegwenti, jekk ikun mistenni li tiżviluppa l-ammonijaka. Fi tmiem dan il-perjodu ta' kundizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Analizi tan-naqal jew il-kostitwenti tiegħu għall-mikroinkwinanti qabel jintużaw tista' tipprovdi informazzjoni siewja.

Thejjija

31. It-tqandil ta' naqal naturali qabel jintuża fil-laboratorju huwa deskritt f'(1)(6)(44). It-thejjija tan-naqal artifiċjali hija deskritta fl-Appendiċi 5.

▼ **M6***Hżin*

32. In-naqal naturali għandu jinħażen fil-laboratorju għall-inqas żmien possibbli. L-EPA tal-Istati Uniti (6) tirrakkomanda perjodu massimu ta' hżin ta' 8 ġimgħat $f4 \pm 2$ °C fid-dlam. Ma għandux ikun hemm spazju vojta fuqani fuq in-naqal fil-kontenituri tal-hżin. Ir-rakkomandazzjonijiet għall-hżin ta' naqal artifiċjali jingħataw fl-Appendiċi 5.

Applikazzjoni tas-sustanza tat-test

33. In-naqal huwa miżjud mas-sustanza tat-test. Il-proċedura ta' zieda tinvolvi kisi ta' kostitwent wiehed jew iktar tan-naqal bis-sustanza tat-test. Pereżempju, ir-ramel kwarzuż, jew sehem minnu (eż. 10 g tar-ramel kwarzuż għal kull reċipjent tat-test), jistgħu jitgħaddsu f'soluzzjoni tas-sustanza tat-test f'solvent xieraq, li mbagħad tiġi evaporata bil-mod sabiex tinxeff. Imbagħad, il-parti miksija tista' titħallat fin-naqal imxarrab. L-ammont ta' ramel ipprovdut mit-tahlita tas-sustanza tat-test u r-ramel irid jiġi kkunsidrat meta jithejja n-naqal, jiġifieri, għalhekk, in-naqal għandu jithejja b'inqas ramel (6).
34. B'naqal naturali, is-sustanza tat-test tista' tiddaħhal permezz ta' zieda ta' sehem imnixxeff tan-naqal kif deskritt iktar 'il fuq għan-naqal artifiċjali, jew permezz ta' thawwid tas-sustanza tat-test fin-naqal imxarrab, b'evaporazzjoni sussegwenti ta' kwalunkwe aġent solubilizzanti użat. Is-solventi xierqa għaž-zieda tan-naqal imxarrab huma l-etanol, il-metanol, l-etilen glikol monometil eter, l-etilen glikol dimetil eter, id-dimetilformamid u l-glikol tat-trietilen (5)(34). It-tossicità u l-volatilità tas-solvent u s-solubilità tas-sustanza tat-test fis-solvent magħżul għandhom ikunu l-kriterji ewlenin għall-għażla ta' aġent solubilizzanti xieraq. F'Environment Canada (1995)(41) tingħata gwida addizzjonali dwar il-proċeduri ta' zieda. Għandha tingħata attenzjoni sabiex jiġi żgurat li s-sustanza tat-test li tiddaħhal man-naqal titqassam sew u b'mod indaq fin-naqal. Is-subkampjuni tal-irreplikati tan-naqal miżjud għandhom jiġu analizzati sabiex jiġu vverifikati l-koncentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test fin-naqal, u sabiex jiġi stabbilit il-grad ta' omoġenità tat-tqassim tas-sustanza tat-test.
35. Ladarba jkun thejja n-naqal miżjud bl-ilma tal-madwar, idealment għandek tħalli s-sustanza tat-test tinqasam bejn in-naqal u l-fażi milwiema. L-aħjar haġa hija li dan isir fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u l-arja użati fit-test. Iz-żmien xieraq ta' ekwilibrazzjoni huwa speċifiku għan-naqal u s-sustanza, u jista' jkun fl-ordni ta' sigħat sa jiem u f'każijiet rari jista' jiehu bosta ġimgħat (4-5 ġimgħat (28)(42)). F'dan it-test, l-ekwilibriju mhuwiex mistenni iżda huwa rrakkomandat perjodu ta' ekwilibriju ta' 48 siegħa sa 7 ijiem. Skont l-iskop tal-istudju, eż, meta jkollhom jiġu imitati l-kundizzjonijiet ambjentali, in-naqal miżjud jista' jiġi ekwibrat jew jithalla jiqdiem għal perjodu itwal (11).

TWETTIQ TAT-TEST**Test preliminari**

36. Jista' jkun siewi li jsir esperiment preliminari sabiex jiġu ottimizzati l-kundizzjonijiet tat-test definittiv, eż. għażla tal-koncentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test u d-durata tal-fażijiet ta' tehid u eliminazzjoni. L-imġiba tad-dud, pereżempju l-evitar tan-naqal, jiġifieri d-dud jahrab min-naqal, xi haġa li tista' tkun ikkaġunata mis-sustanza tat-test u/jew min-naqal stess, għandha

▼ M6

tigi osservata u rreġistrata matul test preliminari. L-evitar tan-naqal jista' jintuża wkoll bħala parametru subletali f'test preliminari sabiex tigi stmata l-koncentrazzjoni(jiet) tas-sustanza tat-test li għandha tintuża f'test tal-bijoakkumulazzjoni.

Kundizzjonijiet ta' espożizzjoni*Durata tal-fażi ta' teħid*

37. L-organizmi tat-test huma esposti għas-sustanza tat-test matul il-fażi ta' teħid. L-ewwel kampjun għandu jittiehed bejn 4 u 24 siegħa minn meta tibda l-fażi ta' teħid. Il-fażi ta' teħid għandha ddum għaddeġja sa 28 jum (1)(6)(11) sakemm ma jkunx jista' jintwera li ntlahaq ekwilibriju qabel. L-istat kostanti jsehh meta: (i) plott tal-fatturi ta' bjoakkumulazzjoni f'kull perjodu ta' kampjunar kontra ż-żmien huwa parallel għall-assi taż-żmien; (ii) tliet analizzijiet suċċessivi tal-BAF li saru fuq kampjuni meħudin f'intervalli ta' tal-inqas jumejn ma jvarjawx minn xulxin b'iktar minn $\pm 20\%$; u (iii) ma hemm ebda differenza sinifikanti bejn it-tliet perjodi ta' kampjunar (fuq il-bażi ta' paraguni statistiċi, eż. analiżi tal-varjanza u analiżi tar-rigressjoni). Jekk l-istat kostanti ma jkunx għadu ntlahaq sal-jum 28, il-fażi ta' teħid tista' tintemm billi tinbeda l-fażi ta' eliminazzjoni, u l-BAF_K jista' jiġi kkalkolat mill-kostanti tar-rata ta' teħid u eliminazzjoni (ara wkoll il-paragrafi 16 sa 18).

Durata tal-fażi ta' eliminazzjoni

38. L-ewwel kampjun għandu jittiehed bejn 4 u 24 siegħa minn meta tibda l-fażi ta' eliminazzjoni, peress li matul il-perjodu inizjali, jistgħu jsehhu bidliet rapidi fir-residwu tat-tessut. Huwa rrakkomandat li tintemm il-fażi ta' eliminazzjoni meta l-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test tkun inqas minn 10 % tal-koncentrazzjoni ta' stat kostanti, jew inkella wara durata massima ta' 10 ijiem. Il-livell ta' residwu fid-dud fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni huwa rrapportat bħala punt ta' tmiem sekondarju. Madankollu, il-perjodu jista' jkun irregolat mill-perjodu li fih il-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud tibqa' oghla mil-limitu ta' detezzjoni analitika.

Organizmi tat-test*Numru ta' dud tat-test*

39. In-numru ta' dud għal kull kampun irid jipprovi massa ta' tessut tad-dud b'tali mod li l-massa tas-sustanza tat-test għal kull kampjun fil-bidu tal-fażi ta' teħid u fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni, rispettivament, tkun ferm oghla mil-limitu ta' detezzjoni għas-sustanza tat-test f'materjal bijoloġiku. Fl-istadji msemmijin tal-fażijiet ta' teħid u eliminazzjoni, il-koncentrazzjoni fl-annimali tat-test normalment tkun relattivament baxxa (6)(8)(18). Peress li l-piż individwali f'hafna speċijiet ta' oligoċaeti akkwatiċi huwa baxx hafna (5-10 mg piż imxarrab għal kull individwu għal *Lumbriculus variegatus* u *Tubifex tubifex*), id-dud ta' kompartment tat-test ta' rreplikati partikolari jista' jiġi raggruppat sabiex jintiżen u għal analiżi tas-sustanza kimika tat-test. Għal speċijiet tat-test b'piż individwali ikbar (eż. *Branchiura sowerbyi*) jistgħu jintużaw irreplikati li fihom individwu wieħed, iżda f'dawn il-kazijiet in-numru ta' rreplikati għandu jiżdied għal hamsa għal kull punt ta' kampjunar (11). Madankollu, ta' min jinnota li *B. sowerbyi* ma kienx inkluz fir-ringtest (12), u għalhekk mhuwiex rakkomandat bħala speċi ideali fil-metodu.
40. Għandu jintuża dud ta' daqs simili (għal *L. variegatus* ara l-Appendiċi 6). Għandu jkun ġej mill-istess sors, u għandu jkun adult jew kbir tal-istess klassi ta' età (ara l-Appendiċi 6). Il-piż u l-età ta' annimal jista' jkollhom effett sinifikanti fuq il-valuri tal-BAF (eż. minhabba kontenut lipidu differenti u/jew il-preżenza ta' bajd); dawn il-parametri għandhom jiġu rreġistrati bi preċiżjoni. Biex tkejjel il-piż xott u mxarrab medju għandu jintiżen subkampjun ta' dud qabel ma jibda t-test.

▼ M6

41. B'*Tubifex tubifex* u *Lumbriculus variegatus*, ir-riproduzzjoni hija mistennija matul il-perjodu ta' ttestjar. Nuqqas ta' riproduzzjoni f'test ta' bjoakkumulazzjoni għandu jiġi rreġistrat, u kkunsidrat meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

Tagħbija

42. Għandhom jintużaw proporzjonijiet għoljin ta' naqal għall-ilma u ilma għad-dud sabiex jiġi mminimizzat it-tnaqqis tal-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal matul il-fażi ta' teħid, u sabiex jiġi evitat tnaqqis fil-koncentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt. Ir-rata ta' tagħbija magħżula għandha tkun tikkorrispondi wkoll għal densitajiet tal-popolazzjoni li jseħhu b'mod naturali tal-ispeċi magħżula (43). Pereżempju, għal *Tubifex tubifex* hija rrakkomandata rata ta' tagħbija ta' 1-4 mg ta' tessut tad-dud (piż imxarrab) għal kull gramma naqal imxarrab (8)(11). Ir-referenzi (1) u (6) jirrakkomandaw rata ta' tagħbija ta' ≤ 1 g piż xott tat-tessut tad-dud għal kull 50 g ta' karbonju organiku tan-naqal għal *L. variegatus*.

43. Id-dud li ser jintuża f'test jitneħħa mill-kultura billi n-naqal tal-kultura jingħadda minn passatur. L-annimali (dud adult jew kbir bla sinjali ta' frammentazzjoni riċenti) jiġu ttrasferiti f'dixxijiet tal-ħġieġ (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma nadif. Jekk il-kundizzjonijiet tat-test ivarjaw mill-kundizzjonijiet tal-kultura, fażi ta' drawwa ta' 24 siegħa għandha tkun biżżejjed. Qabel jintiżen, id-dud għandu jitneħħielu l-ilma żejjed. Dan jista' jsir billi d-dud jitqiegħed bil-galbu fuq karta mxarrba minn qabel. Mhuwiex rakkomandat li tintuża karta assorbenti biex jitnixxef id-dud peress li din tista' tikkaġuna stress jew ħsara lid-dud. Brunson et al. (1998) irrakkomanda l-użu ta' dud mhux ixxottat b'taptip ta' madwar 1,33 darba ikbar mill-bijomassa fil-mira. Dan it-33 % addizzjonali jikkorrispondi għad-differenza bejn id-dud imnixxef bit-taptip u dak li mhuwiex (28).

44. Fil-bidu tal-fażi tat-teħid (jum 0 tat-test), l-organiżmi tat-test jitneħħew mill-kompartiment ta' akklimatizzazzjoni u jitqassmu għal għarrieda f'reċipjenti (eż. dixxijiet petri) li fihom ilma rikostitwit billi jiddaħħlu gruppi ta' żewġ dud f'kull reċipjent, sakemm kull reċipjent ikun fih għaxar dud. Imbagħad, kull wieħed minn dawn il-gruppi jiġi ttrasferit għal għarrieda f'reċipjenti tat-test separati, eż. bl-użu ta' forċipi tal-azzar ħafif. Imbagħad ir-reċipjenti tat-test jiġu inkubati fil-kundizzjonijiet tat-test.

Tmigh

45. Fid-dawl tal-kontenut baxx ta' nutrijenti tan-naqal artifiċjali, in-naqal għandu jiġi emendat b'sors tal-ikel. Sabiex ma tiġix sottovalutata l-espożizzjoni tal-organiżmi tat-test, eż. bit-tmigh selettiv ta' ikel mhux kontaminat, l-ikel meħtieġ għar-riproduzzjoni u t-tkabbir tal-organiżmi tat-test għandu jiddaħħal fin-naqal darba qabel jew matul l-applikazzjoni tas-sustanza tat-test (ara l-Appendiċi 5).

Proporzjon ta' naqal u ilma

46. Il-proporzjon ta' naqal u ilma rrakkomandat huwa ta' 1:4 (45). Dan il-proporzjon jitqies xieraq sabiex il-koncentrazzjonijiet ta' ossiġenu jinżammu f'livelli xierqa u sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni tal-ammonijaka fl-ilma tal-madwar. Il-kontenut ta' ossiġenu fl-ilma tal-madwar għandu jinżamm f'saturazzjoni ta' ≥ 40 %. L-ilma tal-madwar tar-reċipjenti tat-test għandu jingħata f'it arja (eż. 2 — 4 ibzieżaq fis-sekonda) permezz ta' pipetta pasteur imqiegħda madwar 2 cm 'il fuq mill-wiċċ tan-naqal sabiex tonqos kemm jista' jkun il-perturbazzjoni tan-naqal.

▼ M6

Dawl u temperatura

47. Il-fotoperjodu fil-kultura u t-test huwa ta' 16-il siegħa (1)(6). L-intensità tad-dawl fiz-zona tat-test għandha tinżamm għal madwar 500-1 000 lx. It-temperatura għandha tinżamm 20 ± 2 °C matul it-test.

Konċentrazzjonijiet tat-test

48. Tintuża konċentrazzjoni waħda tat-test (l-inqas possibbli) sabiex tiġi stabbilita l-kinetika tat-tehid, iżda tista' tintuża konċentrazzjoni oħra (oghla) (eż. (46)). F'dak il-każ, il-kampjuni jittiehdu u jiġu analizzati fi stat kostanti jew wara l-jum 28 sabiex jiġi kkonfermat il-BAF imkejjel fl-inqas konċentrazzjoni (11). Il-konċentrazzjoni superjuri għandha tingħażel sabiex ikunu jistgħu jiġu esklużi l-effetti avversi (eż. bl-għażla ta' madwar 1 % tal-inqas konċentrazzjoni tal-effett kroniku magħrufa EC_x kif derivata mill-istudji rilevanti dwar it-tossiċità kronika). L-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun ferm oghla mil-limitu ta' detezzjoni fil-kampjuni tan-naqal u bijoloġiċi bil-metodu analitiku użat. Jekk il-konċentrazzjoni tal-effett tas-sustanza tat-test tkun qrib il-limitu ta' detezzjoni analitiku, huwa rrakkomandat li tintuża sustanza tat-test radjutikkettata b'radjuattività speċifika għolja.

Irreplikati Ttrattati u tal-Kontroll

49. In-numru minimu ta' rreplikati ttrattati għall-kejl kinetiċi għandu jkun tal-inqas tlieta għal kull punt ta' kampjunar (11) matul il-fażi ta' tehid u eliminazzjoni. Irreplikati addizzjonali għandhom jintużaw eż. għal dati ta' kampjunar addizzjonali mhux obbligatorji. Għall-fażi ta' eliminazzjoni, jittejjja numru ndaqs ta' rreplikati b'naqal mhux miżjud u ilma tal-madwar, sabiex id-dud ittrattat ikun jista' jiġi ttrasferit mir-riċipjenti ttrattati magħżulin f'reċipjenti mhux ittrattati fi tmiem il-fażi tat-tehid. In-numru totali ta' rreplikati ttrattati għandu jkun biżżejjed kemm għall-fażi ta' tehid kif ukoll għal dik ta' eliminazzjoni.
50. Inkella, id-dud magħżul għall-kampjunar matul il-fażi ta' eliminazzjoni jista' jkun espost f'kontenitur kbir li fih naqal miżjud tal-istess lott bħal dak użat għall-kinetika tat-tehid. Għandu jintwera li l-kundizzjonijiet tat-test (eż. fond tan-naqal, proporzjon ta' ilma/naqal, tagħbija, temperatura, kwalità tal-ilma) huma paragonabbli għall-irreplikati magħżulin għall-fażi tat-tehid. Fi tmiem il-fażi tat-tehid, il-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud għandhom jittiehdu minn dan il-kontenitur sabiex jiġu analizzati, u għandu jitneħħa numru suffiċjenti ta' dud kbir li ma juri ebda sinjal ta' frammentazzjoni riċenti biex jiġi ttrasferit fl-irreplikati mhejjin għall-fażi ta' eliminazzjoni (eż. għaxar organiżmi għal kull riċipjent tal-irreplikati).
51. Jekk ma jintuża ebda solvent iehor għajr l-ilma, għandhom jiġu pprovduti tal-inqas 9 irreplikati ta' kontroll negattiv (tal-inqas 3 kampjunati fil-bidu, 3 fi tmiem it-tehid u 3 fi tmiem l-eliminazzjoni) għal analiżi bijoloġika u tal-isfond. Jekk jintuża xi aġent solubilizzanti għall-applikazzjoni tas-sustanza tat-test, għandu jsir kontroll bis-solvent (tal-inqas 3 irreplikati għandhom jiġu kampjunati fil-bidu, 3 fi tmiem il-fażi tat-tehid, u 3 fi tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni). F'dan il-każ, tal-inqas għandhom jiġu pprovduti 4 irreplikati ta' kontroll negattiv (ebda solvent) għall-kampjunar fi tmiem il-fażi tat-tehid. Dawn l-irreplikati jistgħu jitqabblu bijoloġikament mal-kontroll bis-solvent sabiex tinkiseb informazzjoni fuq l-influenza possibbli tas-solvent fuq l-organiżmi tat-test. Id-dettalji jingħataw fl-Appendiċi 3.

▼ **M6****Il-frekwenza tal-kejliet tal-kwalità tal-ilma**

52. Tal-inqas, għandhom jitkejlu l-parametri tal-ilma li ġejjin fl-ilma tal-madwar matul il-fażi ta' tehid u eliminazzjoni:

It-temperatura	freċipjent wiehed ta' kull livell tat-trattament għal kull data tal-kampjunar, u freċipjent wiehed tal-kontroll fil-ġimgħa u fil-bidu u tmiem il-perjodu ta' tehid u eliminazzjoni; tista' tiġi rreġistrata wkoll it-temperatura fil-midjum tal-madwar (arja ambjentali jew banjumarija) jew freċipjent rappreżentattiv wiehed tat-test eż. f'intervalli kontinwi jew fis-siegha;
Il-kontenut ta' ossiġenu dissolt	freċipjent wiehed ta' kull livell tat-trattament, u freċipjent tal-kontroll wiehed għal kull data ta' kampjunar; mogħti bħala mg/L u % ASV (valur tas-saturazzjoni tal-arja);
Il-provvista tal-arja	kkontrollata tal-inqas darba kuljum (jiem tax-xogħol) u aġġustata jekk ikun hemm bżonn;
Il-pH	freċipjent ittrattat wiehed ta' kull livell tat-trattament għal kull data tal-kampjunar, u freċipjent wiehed tal-kontroll fil-ġimgħa u fil-bidu u tmiem il-perjodu ta' tehid u eliminazzjoni;
L-ebusija totali tal-ilma	tal-inqas freċipjent ittrattat wiehed u reċipjent tat-test tal-kontroll fil-bidu u fi tmiem il-perjodu tat-tehid u ta' eliminazzjoni, mogħti bħala mg/l CaCO_3 ;
Il-kontenut totali ta' ammonijaka	tal-inqas freċipjent ittrattat wiehed u reċipjent tat-test tal-kontroll wiehed fil-bidu u fi tmiem il-perjodu ta' tehid u eliminazzjoni; mogħti bħala mg/l NH_4^+ jew NH_3 jew l-ammonijaka totali-N.

Kampjunar u analiżi tad-dud, in-naqal u l-ilma*Skeda tal-Kampjunar*

53. Fl-Appendiċi 3 jingħataw eżempji tal-iskedi ta' kampjunar għal fażi ta' tehid ta' 28 jum u fażi ta' eliminazzjoni ta' 10 ijiem.
54. Hu kampjun tal-ilma u n-naqal mill-kompartimenti tat-test sabiex tistabbilixxi l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test qabel ma jiddaħħal id-dud, u matul il-fażi ta' tehid kif ukoll ta' eliminazzjoni. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza tat-test jiġu stabbiliti fid-dud, in-naqal u l-ilma sabiex jiġi ssorveljat it-tqassim tas-sustanza tat-test fil-kompartimenti tas-sistema tat-test.
55. Hu kampjun tad-dud, in-naqal u l-ilma tal-inqas sitt darbiet matul il-fażi tat-tehid kif ukoll dik ta' eliminazzjoni.
56. Komplu hu kampjuni sakemm jiġi stabbilit plateau (stat kostanti) (ara l-Appendiċi 1) jew għal 28 jum. Jekk il-plateau ma jintlahaqx fi żmien 28 jum, ibda bil-fażi ta' eliminazzjoni. Meta tibda l-fażi ta' eliminazzjoni, ittrasferixxi d-dud magħżul biex tirreplika l-kompartimenti li fihom naqal mhux ittrattat u ilma (ara wkoll il-paragrafi 17 u 18).

Kampjunar u thejġija tal-kampjun

57. Ikseb kampjuni tal-ilma b'dekantazzjoni, tbatil b'pajp jew pipetta ta' volum suffiċjenti biex tkun tista' tkejjel il-kwantità tas-sustanza tat-test fil-kampjun.
58. L-ilma tal-madwar li jifdal jiġi dekantat jew jitbattal b'pajp bil-galbu mill-kompartiment(i) tat-test. Il-kampjuni tan-naqal għandhom jittiehdu bil-galbu, b'tali mod li jikkawunaw tfixkil minimu lid-dud.

▼ **M6**

59. Nehhi d-dud kollu mill-irreplikati tat-test fil-hin tal-kampjunar, eż. billi tissospendi n-naqal bl-ilma tal-madwar u tifrex il-kontenuti ta' kull irreplikati fuq trej baxxa u billi taqbad id-dud billi tuza forċipi tal-azzar artab. Lahlahhom malajr bl-ilma fi trej baxxa tal-ħġieġ jew tal-azzar. Nehhi l-ilma żejjed. Ittrasferixxi d-dud bil-galbu f'reċipjent li ntiżen minn qabel u iżinhom. Issa-grifika d-dud billi tiffriża (eż. $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Il-preżenza u n-numru ta' fosdqiet tal-larva u/jew żġhar għandhom jiġu rreġistrati.
60. B'mod ġenerali, id-dud għandu jintiżen u jiġi ssagrifikat eżatt wara l-kampjunar mingħajr fażi ta' żvujtar tal-imsaren biex jinkiseb BAF konservattiv li jinkludi kontenut kontaminat tal-imsaren, u jiġi evitat it-telf tar-residwi tal-ġisem matul kwalunkwe perjodu ta' żvujtar tal-imsaren fl-ilma biss (8). Sustanzi b'log K_{ow} ta' iktar minn 5 mħumiex mistennijin li jiġu eliminati b'mod sinifikanti matul xi perjodu ta' żvujtar tal-imsaren fl-ilma biss, filwaqt li sustanzi b'log Kow ta' inqas minn 4 jistgħu jintilfu f'ammonti notevoli (47).
61. Matul il-fażi ta' eliminazzjoni, id-dud jiżvoġta l-imsaren tiegħu f'naqal nadif. Dan ifisser li l-kejliet eżatt qabel il-fażi ta' eliminazzjoni jinkludu naqal bl-imsaren ikkontaminat, filwaqt li wara l-ewwel 4-24 siegħa tal-fażi ta' eliminazzjoni, hafna mill-kontenut tal-imsaren ikkontaminat huwa supponut li jkun ġie sostitwit minn naqal nadif (11)(47). Imbagħad, il-koncentrazzjoni fid-dud ta' dan il-kampjun tista' titqies bħala l-koncentrazzjoni tat-tessut wara l-iżvujtar tal-imsaren. Biex jingħata kont għad-dilwizzjoni tal-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal mhux ikkontaminat matul il-fażi ta' eliminazzjoni, il-piż tal-kontenut tal-imsaren jista' jiġi smat mill-proporzjonijiet tal-piż imxarrab tad-dud/piż tal-irmied tad-dud jew il-piż xott tad-dud/piż tal-irmied tad-dud.
62. Jekk l-iskop ta' studju speċifiku jkun li jkejjel il-bijodisponibilità u r-residwi tat-tessuti veri fl-organizmi tat-test, f'dak il-każ tal-inqas subkampjun ta' animali trattati (eż. mit-tliet reċipjenti tal-irreplikati addizzjonali), idealment kampjunati matul stat kostanti, għandhom jintiżnu, jiżvoġtaw filma nadif għal perjodu ta' 6 sigħat (47), u jergġu jintiżnu qabel l-analiżi. Imbagħad, id-dejta dwar il-piż tad-dud u l-koncentrazzjoni fil-ġisem ta' dan is-subkampjun tista' titqabbel mal-valuri miksubin minn dud li ma żvoġtax. Id-dud magħżul sabiex titkejjel l-eliminazzjoni ma għandux jiżvoġta qabel it-trasferiment f'naqal nadif sabiex jiġi mminimizzat l-istress żejjed għall-animali.
63. Idealment analizza l-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud eżatt (jiġifieri fi żmien jum sa jumejn) wara t-tneħħija sabiex tevita degradazzjoni jew telf iehor u tikkalkola r-rati ta' teħid u eliminazzjoni approssimati int u tipproċedi bit-test. Analizi minnufih tevita wkoll dewmien fl-istabbiliment ta' jekk intlaħqax plateau.
64. Jekk ma ssirx analizi minnufih, il-kampjuni għandhom jinħażnu f'kundizzjonijiet xierqa. Ikseb informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-kundizzjonijiet xierqa ta' ħżin għas-sustanza tat-test partikolari qabel tibda l-istudju, (eż. id-durata u t-temperatura tal-ħżin, il-proċeduri ta' estrazzjoni, eċċ.). Jekk it-tali informazzjoni ma tkunx disponibbli u jiġi ġġudikat li hija neċessarja, jistgħu jsiru tessuti tal-kontroll miżjudin fl-istess hin sabiex tiġi stabbilita l-istabbiltà tal-ħżin.

Kwalità tal-metodu analitiku

65. Peress li essenzjalment il-proċedura sħiħa hija rregolata mill-preċiżjoni, ir-reġqa u s-sensittività tal-metodu analitiku użat għas-sustanza tat-test, i-verifika bl-esperimenti li l-preċiżjoni u r-riproducibilità tal-analiżi kimika, kif ukoll l-irkupru tas-sustanza tat-test mill-kampjuni tal-ilma, in-naqal u

▼ M6

d-dud huma sodisfaċenti għall-metodu partikolari. Barra minn hekk, għandek tivverifika li s-sustanza tat-test ma tinsabx fil-kompartimenti tal-kontroll f'koncentrazzjonijiet oghla mill-isfond. Jekk ikun hemm bżonn, ikkoreġi l-valuri ta' C_w , C_s u C_a għall-irkupri u l-valuri ta' sfond tal-kontrolli. Qandel il-kampjuni kollha matul it-test b'tali mod li tnaqqas kemm jista' jkun il-kontaminazzjoni u t-telf (eż. li jirrizultaw mill-assorbiment tas-sustanza tat-test fuq l-apparat tal-kampjunar).

66. L-irkupru ġenerali u l-irkupru tas-sustanza tat-test fid-dud, in-naqal, l-ilma u, jekk jintużaw, fin-nases li fihom l-assorbenti biex iżommu s-sustanza tat-test evaporata, għandhom jiġu rreġistrati u rrapportati.
67. Peress li huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi radjutikkettati, huwa possibbli li tiġi analizzata r-radjuattività totali (jiġifieri l-prodotti prinċipali u ta' degradazzjoni). Madankollu, jekk din tkun analitikament fattibbli, il-kwantifikazzjoni tas-sustanza prinċipali u l-prodotti ta' degradazzjoni fi stat kostanti jew fi tmiem il-fażi tat-tehid tista' tipprovi informazzjoni importanti. Jekk huwa mahsub li ser isiru t-tali kejl, il-kampjuni għandhom jiġu soġġetti għal proċeduri xierqa ta' estrazzjoni sabiex is-sustanza prinċipali tkun tista' tiġi kkwantifikata għaliha. Meta prodott ta' degradazzjoni identifikat ikun jirrappreżenta perċentwal importanti (eż. > 10 %) mir-radjuattività mkejla fl-organizmi tat-test fi stat kostanti jew fi tmiem il-fażi tat-tehid, huwa rrakkomandat li jiġu identifikati t-tali prodotti ta' degradazzjoni (5).
68. Minhabba bijomassa individwali baxxa, spiss ma jkunx possibbli li tiġi stabbilita l-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'kull dudu individwali, sakemm ma tintużax Branchiura sowerbyi (40-50 mg piż imxarrab għal kull dudu) bħala speċi tat-test (11). Għaldaqstant, ir-raggruppament tal-individwi kampjunati minn reċipjent tat-test partikolari huwa aċċettabbli, iżda dan jillimita l-proċeduri statistiċi li jistgħu jiġu applikati għad-dejta. Jekk proċedura statistika speċifika u s-saħħa huma kunsiderazzjonijiet importanti, fdak il-każ fit-test għandu jiġi inkluz numru adegwat ta' annimali tat-test u/jew kompartimenti tat-test tal-irreplikati sabiex jilqgħu ir-raggruppament, proċedura u saħħa mehtieġa.
69. Huwa rrakkomandat li l-BAF jingħata kemm bħala funzjoni tal-piż imxarrab totali u l-piż xott totali kif ukoll, meta mehtieġ (eż. għal sustanzi ferm lipo-filiċi) bħala funzjoni tal-kontenut lipidu u t-TOC tan-naqal. Għandhom jintużaw metodi xierqa sabiex jiġi stabbilit il-kontenut lipidu (48)(49). It-teknika ta' estrazzjoni bil-kloroform/metanol (50) tista' tkun irrakkomandata bħala metodu standard (48). Madankollu, biex tevita milli tuża solventi klorinati, tista' tintuża modifika ringtested tal-metodu Bligh & Dyer (50) kif deskritt f'(51). Peress li bosta metodi ma jagħtux l-istess valuri (48), importanti li tispjega l-metodu użat fid-dettall. Meta jkun possibbli, jiġifieri jekk ikun hemm biżżejjed tessut tad-dud, il-kontenut lipidu jitkejjel fl-istess kampjun jew estratt bħal dak prodott għall-analiżi tas-sustanza tat-test, peress li spiss il-lipidi jkunu jridu jitnehhew mill-estratt qabel jiġi analizzat bi kromatografja (5). Madankollu, huwa prattiku li jintużaw annimali tal-kontroll imdorrijin tal-inqas fil-bidu jew — idealment — fi tmiem il-fażi tat-tehid sabiex jitkejjel il-kontenut lipidu, eż. fi tliet kampjuni.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattamento tar-riżultati

70. Il-kurva tat-tehid tas-sustanza tat-test tinkiseb billi fl-iskala aritmetika tipplottja l-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud/fuqu matul il-fażi

▼ **M6**

tat-tehid kontra ż-żmien. Jekk il-kurva lahqet plateau, ikkalkola l-BAF_{ss} tal-istat kostanti:

$$\frac{C_a \text{ fi stat kostanti jew fil - jum 28 (medja)}}{C_s \text{ fi stat kostanti jew fil - jum 28 (medja)}}$$

71. Stabbilixxi l-fattur tal-bijoakkumulazzjoni kinetika (BAFK) bħala l-proporzjon ks/ke. Normalment il-kostanti ta' eliminazzjoni (ke) jiġi stabbilit mill-kurva ta' eliminazzjoni (jiġifieri plott tal-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud matul il-fażi ta' eliminazzjoni). Imbagħad il-kostanti tar-rata tat-tehid ks jiġi kkalkolat mill-kinetika tal-kurva tat-tehid. Il-metodu ppreferit għall-kisba tal-BAFK u l-kostanti tar-rata, ks u ke, huwa li jintużaw metodi ta' stima tal-parametri mhux lineari fuq kompjuter (ara l-Appendiċi 2). Jekk l-eliminazzjoni ovvjament mhijiex l-ewwel ordni, f'dak il-każ għandhom jithaddmu mudelli iktar kumplessi (25)(27)(52).
72. Il-fattur ta' akkumulazzjoni tan-naqal-bijota (BSAF) huwa stabbilit billi jiġi normalizzat il-BAFK għall-kontenut lipidu tad-dud u l-kontenut ta' karbonju organiku totali tan-naqal.

Interpretazzjoni tar-riżultati

73. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati bil-galbu meta l-koncentrazzjonijiet imkejlin tal-koncentrazzjonijiet tat-test isehhu f'livelli qrib il-limitu ta' detezzjoni tal-metodu analitiku użat.
74. Kurvi ta' tehid u eliminazzjoni ddefiniti ċari huma indikazzjoni ta' dejta dwar il-bijoakkumulazzjoni ta' kwalità tajba. Generalment, il-limiti tal-kunfidenza għall-valuri tal-BAF minn studji ddizinjati kif suppost ma jaqbzux il-25 % (5).

Rapport tat-test

75. Ir-rapport tat-test irid ikun jinkludi l-informazzjoni li ġejja.

Sustanza tat-test

- l-ghamla fizika u, il-karatteristiċi fizikokimiċi, eż. il-log K_{ow}, is-solubilità fl-ilma;
- dejta dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika; is-sors tas-sustanza tat-test, l-identità u l-koncentrazzjoni ta' kwalunkwe solvent użat;
- jekk radjutikkettata, il-pożizzjoni eżatta tal-atomi tikkettati, ir-radjuattività speċifika, u l-perċentwal ta' radjuattività assoċjata mal-impuritajiet.

Speċijiet tat-test

- l-isem xjentifiku, ir-razza, is-sors, kwalunkwe pretrattament, l-akklimazzjoni, l-età, il-medda ta' daqsijiet, eċċ..

Kundizzjonijiet tat-test

- il-proċedura tat-test użata (eż. statiku, semistatiku jew bi fluss kontinwu);
- it-tip u l-karatteristiċi tal-illuminazzjoni użata u l-fotoperjodu/i;
- id-disinn tat-test (eż. in-numru, il-materjal u d-daqs tal-kompartimenti tat-test, il-volum ta' ilma, il-massa u l-volum tan-naqal, ir-rata ta' sostituzzjoni tal-volum ta' ilma (għal proċeduri bi fluss kontinwu jew semistatiki), kwalunkwe arja li tingħata qabel u matul it-test, in-numru ta' irreplicati, in-numru ta' dud għal kull irreplicat, in-numru ta' konċentrazzjonijiet tat-test, it-tul tal-fażijiet ta' tehid u eliminazzjoni, il-frekwenza tal-kampjunar);

▼ **M6**

- il-metodu ta' thejjiġa u applikazzjoni tas-sustanza tat-test kif ukoll ir-raġunijiet għall-għażla ta' metodu speċifiku;
- il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test;
- is-sors tal-kostitwenti tal-ilma u n-naqal artifiċjali jew — jekk jintużaw midjums naturali — l-origini tal-ilma u n-naqal, deskrizzjoni ta' kwalunkwe pretrattament, ir-riżultati ta' kwalunkwe wiri tal-hila tal-annimali tat-test sabiex jgħixu u/jew jirriproduċu fil-midjums użati, il-karatteristiċi tan-naqal (il-pH u l-ammonijaka tal-ilma tal-pori (naqal naturali), il-kontenut ta' karbonju organiku (TOC), id-distribuzzjoni tad-daqs tal-partikoli (perċentwal ta' ramel, fajd u tafal), il-kontenut perċentwali ta' ilma, u kwalunkwe kejl iehor li sar) u l-karatteristiċi tal-ilma (il-pH, l-ebusija, il-kondottività, it-temperatura, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt, il-livelli ta' klorur residwu (jekk imkejjel) u kwalunkwe kejl iehor li sar);
- il-piż xott nominali u mkejjel f' % ta' piż imxarrab (jew il-proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) tan-naqal artifiċjali; il-piż xott imkejjel f' % tal-piż imxarrab (jew il-proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) għal naqal mill-ghelieqi;
- il-kwalità tal-ilma fi hdan il-kompartimenti tat-test kif ikkaratterizzata mit-temperatura, il-pH, l-ammonijaka, l-ebusija totali u l-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt;
- informazzjoni ddettaljata dwar it-trattament tal-kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud, inklużi dettalji dwar it-thejjiġa, il-hżin, il-proċeduri ta' zieda, l-estrazzjoni u l-proċeduri analitiċi (u l-preċiżjoni) għas-sustanza tat-test u l-kontenut lipidu, u l-irkupru tas-sustanza tat-test.

Riżultati

- il-mortalità tad-dud tal-kontroll u d-dud f'kull kompartiment tat-test u kwalunkwe effett subletali osservat inkluża mġiba anormali (eż., evitar tan-naqal, il-preżenza jew l-assenza ta' gerbub tar-rawt, nuqqas ta' riproduzzjoni);
- il-piż xott imkejjel f' % ta' piż imxarrab (jew proporzjon ta' piż xott għal piż imxarrab) tan-naqal u l-organizmi tat-test (utli għan-normalizzazzjoni);
- il-kontenut lipidu tad-dud;
- kurvi li juru l-kinetika tat-tehid u l-eliminazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud, u ż-żmien sal-istat kostanti;
- C_a , C_s u C_w (b'devjazzjoni u medda standard, jekk xieraq) għaż-żminijiet kollha tal-kampjunar (C_a fi $g\ kg^{-1}$ piż imxarrab u xott tal-ġisem shiħ, C_s mogħti f' $g\ kg^{-1}$ piż imxarrab u xott tan-naqal, u C_w f' $mg\ l^{-1}$). Jekk huwa meħtieġ fattur ta' akkumulazzjoni tal-bijota-naqal (BSAF; ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjoni) (eż. għal paragun tar-riżultati minn żewġ testijiet jew iktar imwettqin b'annimali b'kontenut lipidu differenti), C_a għandu jingħata wkoll bħala $g\ kg^{-1}$ kontenut lipidu tal-organizmu, u C_s għandu jingħata bħala $g\ kg^{-1}$ karbonju organiku (OC) tan-naqal;
- BAF (mogħti f' kg naqal imxarrab kg^{-1} dud imxarrab), il-kostanti tar-rata tat-tehid tan-naqal k_s (mogħti f' g naqal imxarrab kg^{-1} tad-dud imxarrab j^{-1}), u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni k_e (mogħti f' $l\ j^{-1}$); il-BSAF (mogħti f' kg OC tan-naqal kg^{-1} kontenut lipidu tad-dud) jista' jiġi rrapportat ukoll;

▼ M6

- Residwi mhux eliminati (NER) fi tmiem il-faži ta' eliminazzjoni;
- jekk jitkejlu: il-perċentwali tas-sustanza prinċipali, il-prodotti ta' degradazzjoni, u r-residwi maqbudin (jiġifieri l-perċentwal tas-sustanza tat-test li ma jistax jiġi estratt b'metodi komuni ta' estrazzjoni) identifikati fl-annimali tat-test;
- il-metodi użati għal analizzijiet statistiċi tad-dejta.

Evalwazzjoni tar-riżultati

- il-konformità tar-riżultati mal-kriterji ta' validità kif elenkat fil-paragrafu 21;
- riżultati mhux mistennijin jew mhux tas-soltu, eż. eliminazzjoni mhux shiħa tas-sustanza tat-test mill-annimali tat-test; f'dawn il-każijiet, ir-riżultati minn kwalunkwe studju preliminari jistgħu jipprovdi informazzjoni siewja.

▼ **M6***Appendiċi 1***Definizzjonijiet u unitajiet**

Naqal artifiċjali, jew naqal ifformulat, rikostitwit jew sintetiku huwa tahlita ta' materjali użati biex jimitaw il-komponenti fiżiċi ta' naqal naturali.

Il-bijoakkumulazzjoni hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organizmu jew fuq organismu b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar. Ir-riżultati tal-bijoakkumulazzjoni kemm mill-proċess ta' bijokonċentrazzjoni kif ukoll ta' bijofokalizzazzjoni (ara iktar 'il quddiem).

Il-fattur ta' bijoakkumulazzjoni (BAF) fi kwalunkwe waqt matul il-fażi tat-tehid ta' dan it-test ta' bijoakkumulazzjoni huwa l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organizmu tat-test jew fuqu (C_a f'g kg^{-1} piż xott jew imxarrab) diviża bil-konċentrazzjoni tas-sustanza fil-midjum tal-madwar (C_s bhala g kg^{-1} tal-piż imxarrab jew xott tan-naqal). Sabiex isir riferiment għall-unitajiet ta' C_a u C_s , il-BAF għandu l-unitajiet ta' kg kg^{-1} dudu (15).

Il-fatturi ta' bijoakkumulazzjoni kkalkolati direttament mill-proporzjon tal-kostanti tar-rata tat-tehid tan-naqal diviż bil-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_s u k_e , rispettivament — ara iktar 'il quddiem) jissejhu l-fattur ta' bijoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K).

Il-bijokonċentrazzjoni hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test f'organizmu jew fuqu, li tirriżulta esklussivament mit-tehid permezz tal-wiċċ tal-gisem, b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-bijofokalizzazzjoni hija ż-żieda fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test jew f'organizmu jew fuqu, li tirriżulta primarjament mit-tehid minn ikel jew priża kontaminati, b'rabta mal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-ikel jew il-priża. Il-bijofokalizzazzjoni tista' twassal għal trasferiment jew akkumulazzjoni tas-sustanza tat-test fi hdan il-ktajjen alimentari.

Il-fattur ta' akkumulazzjoni tal-bijota-naqal (BSAF) huwa l-konċentrazzjoni tal-istat kostanti normalizzata għal-lipidi tas-sustanza tat-test f'organizmu tat-test jew fuqu diviża bil-konċentrazzjoni normalizzata għall-karbonju organiku tas-sustanza fin-naqal fi stat kostanti. Imbagħad C_a jingħata bhala g kg^{-1} kontenut lipidu tal-organizmu, u C_s bhala g kg^{-1} kontenut organiku tan-naqal.

Il-perjodu ta' kundizzjonament jintuża biex jiġi stabbilit il-komponent mikrobjali tan-naqal u titneħħa eż. ammonijaka li toriġina mill-komponenti tan-naqal; isehh qabel ma tiżdied is-sustanza tat-test man-naqal. Normalment, l-ilma tal-madwar jintrema wara l-kundizzjonament.

L-eliminazzjoni ta' sustanza tat-test hija t-telf ta' din is-sustanza mit-tessut tal-organizmu tat-test bi proċessi attivi jew passivi li jsehh indipendentement mill-preżenza jew l-assenza tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar.

Il-fażi ta' eliminazzjoni hija ż-żmien, wara t-trasferiment tal-organizmi tat-test minn midjum kontaminat għal midjum hieles mis-sustanza tat-test, li matulu tiġi studjata l-eliminazzjoni (jew it-telf nett) tas-sustanza mill-organizmi tat-test.

Il-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' tnaqqis fil-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organizmu tat-test/fuqu, wara t-trasferiment tal-organizmi tat-test minn midjum li fih is-sustanza tat-test għal midjum hieles mis-sustanza kimika; k_e jingħata mogħti fil- d^{-1} .

▼ **M6**

Il-perjodu ta' ekwilibrazzjoni jintuża biex is-sustanza tat-test tkun tista' titqassam bejn il-faži solida, l-ilma tal-pori u l-ilma tal-madwar; isehh wara li s-sustanza tat-test tizdied man-naqal u qabel ma jiddahhlu l-organizmi tat-test.

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni ottanol/ilma (K_{ow}) huwa l-proporzjon tas-solubilità ta' sustanza fl-n-ottanol u fl-ilma f'ekwilibriju, xi kultant mogħti bhala P_{ow} . Il-logaritmu ta' K_{ow} ($\log K_{ow}$) jintuża bhala indikazzjoni tal-potenzjal ta' sustanza għal akkumulazzjoni bijoloġika minn organizmi akwatiċi.

Il-koeffiċjent ta' partizzjoni karbonju organiku/ilma (K_{oc}) huwa l-proporzjon tal-koncentrazzjoni ta' sustanza fuq jew fil-frazzjoni ta' karbonju organiku ta' naqal u l-koncentrazzjoni tas-sustanza fl-ilma f'ekwilibriju.

L-ilma tal-madwar huwa l-ilma li jinsab fuq in-naqal fir-riċipjent tat-test.

Plateau jew **stat kostanti** huwa ddefinit bhala l-ekwilibriju bejn il-proċessi ta' tehid u eliminazzjoni li jsehhu fl-istess hin matul il-faži ta' espożizzjoni. L-istat kostanti jintlahaq fil-plott tal-BAF f'kull perjodu ta' kampjunar kontra ż-żmien meta l-kurva ssir parallela għall-assi taż-żmien u tliet analiżijiet suċċessivi tal-BAF li jsiru fuq kampjuni meħudin f'intervalli tal-inqas jumejn ikunu fi hdan 20 % minn xulxin, u ma jkun hemm ebda differenza statistikament importanti fost it-tliet perjodi ta' kampjunar. Għas-sustanzi tat-test li jittiehdu bil-mod, intervalli ta' sebat ijiem ikunu iktar xierqa (5).

Ilma tal-pori jew ilma interstizjali huwa l-ilma li jikkupa l-ispazju bejn in-naqal jew il-partikoli tal-hamrija.

Il-kostanti tar-rata ta' tehid tan-naqal (k_s) huwa l-valur numeriku li jiddefinixxi r-rata ta' zieda fil-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organizmu tat-test jew fuqu li tirriżulta mit-tehid mill-faži tan-naqal. k_s jingħata fi g naqal kg^{-1} dud d^{-1} .

In-naqal miżjud huwa n-naqal li fih tiddahhal is-sustanza tat-test.

Il-fattur ta' bjoakkumulazzjoni fi stat kostanti (BAF_{ss}) huwa l-BAF fi stat kostanti u li ma jinbidilx hafna matul perjodu itwal ta' żmien, il-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fil-midjum tal-madwar (C_s bhala g kg^{-1} tal-piż imxarrab jew xott tan-naqal) li tkun kostanti matul dan il-perjodu ta' żmien.

Il-faži ta' tehid jew espożizzjoni hija ż-żmien li matulu l-organizmi tat-test ikunu esposti għas-sustanza tat-test.

▼ M6

Appendiċi 2

Kalkolu tal-parametri tat-tehid u l-eliminazzjoni

Il-punt ta' tmiem ewlieni ta' test ta' bjoakkumulazzjoni huwa l-fattur ta' bjoakkumulazzjoni, BAF. Il-BAF imkejjel jista' jiġi kkalkolat billi tiġi diviża l-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-organizmu tat-test, C_a , bil-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fin-naqal, C_s , fi stat kostanti. Jekk l-istat kostanti ma jintlahaqx matul il-fażi tat-tehid, il-BAF jiġi kkalkolat bl-istess mod għall-jum 28. Madankollu, għandu jiġi indikat jekk il-BAF huwiex ibbażat fuq konċentrazzjonijiet fi stat kostanti jew le.

Il-mezz ippreferut sabiex jinkisbu l-fattur ta' bjoakkumulazzjoni kinetika (BAF_K), il-kostanti tar-rata ta' tehid tan-naqal (k_s) u l-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni (k_e) huwa li jintużaw metodi ta' stima tal-parametri mhux lineari fuq kompjuter. Minhabba l-medda ta' żmien tal-fatturi medji ta' akkumulazzjoni (C_a , il-valuri medji ta' kull data ta' kampjunar/ C_s , il-valuri medji ta' kull data ta' kampjunar = AF) tal-fażi tat-tehid fuq il-bażi tal-piż imxarrab tad-dud u tan-naqal, u l-ekwazzjoni mudell

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [\text{ekwazzjoni 1}]$$

fejn $AF(t)$ huwa l-proporzjon tal-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fid-dud u l-koncentrazzjoni tagħha fin-naqal fi kwalunkwe waqt (t) tal-fażi tat-tehid, dawn il-programmi tal-kompjuter jikkalkolaw il-valuri għall- BAF_K , k_s u k_e .

Meta jintlahaq l-istat kostanti matul il-fażi tat-tehid (jiġifieri $t = \infty$), l-ekwazzjoni 1 tista' titnaqqas għal:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{ekwazzjoni 2}]$$

fejn

k_s = il-kostanti tar-rata tat-tehid fit-tessut [g naqal kg^{-1} dud d^{-1}]

k_e = il-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni [d^{-1}]

Imbagħad $k_s/k_e \times C_s$ huwa approċċ għall-koncentrazzjoni tas-sustanza tat-test fit-tessut tad-dud fi stat kostanti ($C_{a,ss}$).

Il-Fattur ta' Akkumulazzjoni ta' Bijota-Naqal (BSAF) għandu jiġi kkalkolat kif ġej:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

fejn f_{oc} hija l-frazzjoni tal-karbonju organiku tan-naqal, u l-flip hija l-frazzjoni tal-lipidu tad-dud, bit-tnejn li huma bbażati fuq piż xott jew inkella fuq piż imxarrab.

Minhabba l-medda ta' żmien tal-valuri tal-koncentrazzjoni, il-kinetika tal-koncentrazzjoni tista' tiġi mmudellata bl-użu tal-ekwazzjonijiet mudell li ġejjin u metodu ta' stima tal-parametru mhux lineari bbażat fuq kalkolu bil-kompjuter.

Ir-residwu mkejjel medju tal-ġisem fi tmiem il-fażi tat-tehid huwa rakkomandat bħala l-punt tat-tluq predefinit. L-użu tal-valur immudellat/stima mill-fażi tat-tehid għandu jsir biss, eż., jekk il-valur imkejjel ivarja b'mod sinifikanti mir-residwu tal-ġisem immudellat. Ara wkoll il-paragrafu 50 għal preespożizzjoni alternattiva tad-dud magħżul għall-eliminazzjoni; b'dan l-approċċ, kampjuni ta' dan id-dud preespost fil-jum 0 tal-fażi ta' eliminazzjoni jitqiesu li jipprovdu residwu tal-ġisem realistiku biex bih tinbeda l-kinetika tal-eliminazzjoni.

▼ M6

Jekk il-punti tad-dejta plottjati kontra ż-żmien jindikaw tnaqqis esponenzjali kostanti tal-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test fl-annimali, jista' jintuża mudell b'kompartiment wiehed (ekwazzjoni 4) sabiex jiġi deskritt kif sehhiet l-eliminazzjoni maż-żmien.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{ekwazzjoni 3}]$$

Il-proċessi ta' eliminazzjoni kultant jidhru li huma bifaziċi, u juru tnaqqis mgħagħġel ta' C_a matul il-fażijiet bikrin, li jinbidel f'telf iktar kajman tas-sustanza tat-test fil-fażijiet avvanzati tal-eliminazzjoni (8)(19)(25)). Iż-żewġ fażijiet jistgħu jiġu interpretati bis-suppożizzjoni, li hemm żewġ kompartimenti differenti fl-organizmu, li minnhom is-sustanza tat-test tintilef b'veloċità differenti. F'dawn il-kazijiet, għandu jiġi studjat tagħrif speċifiku (15)(16)(17)(25).

Eliminazzjoni b'żewġ kompartimenti hija deskritta, eż., bl-ekwazzjoni li ġejja (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{-k_b \times t} \quad [\text{ekwazzjoni 4}]$$

A u B jirrappreżentaw id-daqs tal-kompartimenti (f'percentwal tar-residwu tat-tessut ġenerali), fejn A huwa l-kompartiment b'telf rapidu tas-sustanza, u B huwa l-kompartiment b'telf bil-mod tas-sustanza tat-test. Is-somma ta' A u B tkun 100 % tal-volum tal-kompartimenti tal-annimali shaħ fi stat kostanti. k_a u k_b jirrappreżentaw il-kostanti ta' eliminazzjoni korrispondenti [d^{-1}]. Jekk il-mudell b'żewġ kompartimenti jitqabbel mad-dejta dwar id-depurazzjoni, il-kostanti tar-rata ta' tehid k_s jista' jiġi stabbilit kif ġej (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad [\text{ekwazzjoni 5}]$$

Dawn l-ekwazzjonijiet mudell xorta wahda għandhom jintużaw bil-galbu, speċjalment meta jsehhu bidliet fil-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test matul it-test (42).

Bħala alternattiva għall-ekwazzjonijiet mudell deskritti iktar 'il fuq, il-kinetika (k_s u k_e) tista' tiġi kkalkolata wkoll f'sensiela wahda billi jiġi applikat il-mudell tal-kinetika tal-ewwel ordni għad-dejta kollha mill-fażi tat-tehid kif ukoll minn dik ta' eliminazzjoni f'daqqa. Għal deskrizzjoni ta' metodu li jista' jippermetti li jsir kalkolu kombinat bħal dan tal-kostanti tar-rata ta' eliminazzjoni u ta' tehid, jistgħu jiġu kkonsultati r-referenzi (55), (56) u (57).

Ir-Residwi Mhux Eliminati (NER) għandhom jiġu kkalkolati bħala punt ta' tmiem sekondarju billi jiġi multiplikat il-proporzjon tal-konċentrazzjoni medja fid-dud (C_a) fil-jum 10 tal-fażi ta' eliminazzjoni u l-konċentrazzjoni medja fid-dud (C_a) fi stat kostanti (jum 28 tal-fażi tat-tehid) b'100:

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ at the end of elimination(average)} \times 100}{C_a \text{ at steady state(average)}}$$

▼ **M6***Appendiċi 3***Eżempju ta' skeda tal-kampjunar għal test tal-bijoakkumulazzjoni ta' 28 jum****a) Fazi tat-tehid (inkluża fazi ta' ekwilibrazzjoni ta' 4 ijiem)**

Jum	Attivitajiet
– 6	Thejjija tas-sospensjoni tal-pit għan-naqal; kondizzjonament tas-sospensjoni għal 48 siegħa;
– 4	Naqal jew frazzjoni tan-naqal miżjudin; tahlit tal-kostitwenti kollha tan-naqal; tnehhija tal-kampjuni tan-naqal ta' naqal ittrattat u dak tal-kontroll bis-solvent sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; mili tal-ilma tal-madwar; inkubazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test (fazi ta' ekwilibrazzjoni);
– 3/– 2	Separazzjoni tal-organizmi tat-test mill-koltura għall-akklimatizzazzjoni;
0	Kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); tnehhija tal-irreplikati għat-tehid ta' kampjuni tal-ilma u n-naqal sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; tqassim għal għarrieda tad-dud fil-kompartimenti tat-test; żamma ta' biżżejjed subkampjuni ta' dud sabiex jiġu stabbiliti l-valuri ta' sfond analitiċi; il-kontroll tal-provvista tal-arja, jekk tintuża sistema ta' test magħluq;
1	Tnehhija tal-irreplikati għall-kampjunar; kontroll tal-provvista tal-arja, l-imġiba tad-dud, il-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 56); tehid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;
2	Kontroll tal-provvista tal-arja, imġiba tad-dud u temperatura;
3	L-istess bħall-jum 1;
4 — 6	L-istess bħall-jum 2;
7	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
8 — 13	L-istess bħall-jum 2;
14	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
15 — 20	L-istess bħall-jum 2;
21	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għal ilma evaporat jekk hemm bżonn;
22 — 27	L-istess bħall-jum 2;
28	L-istess bħall-jum 1; kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); tmiem tal-fazi tat-tehid; żamma ta' biżżejjed subkampjuni ta' dud sabiex jiġu stabbiliti l-valuri ta' sfond analitiċi, il-piż xott u l-piż imxarrab, u l-kontenut lipidu; trasferiment tad-dud mill-irreplikati esposti li jifdal f'reċipjenti li fihom naqal nadif għall-fazi ta' eliminazzjoni (ebda żvojtjar tal-imsaren); kampjunar tal-ilma, in-naqal u d-dud minn kontrolli bis-solvent; kampjunar tas-soluzzjonijiet ta' nases, jekk ikunu installati.
	L-attivitajiet ta' qabel l-espozizzjoni (fazi ta' ekwilibrazzjoni) għandhom jiġu skedati filwaqt li jittiehdu f'kunsiderazzjoni l-karatteristiċi tas-sustanza tat-test. Jekk ikun hemm bżonn, kondizzjonament tan-naqal imhejji fl-ilma tal-madwar f'20 ± 2 °C għal 7 ijiem; f'dan il-każ, thejjija bikrija tan-naqal!
	L-attivitajiet deskritti għall-jum 2 għandhom isiru kuljum (tal-inqas fil-jiem tax-xogħol).

▼ **M6**b) **Fażi ta' eliminazzjoni**

Jum	Attivitajiet
– 6	Thejjija tas-sospensjoni tal-pit għan-naqal; kondizzjonament tas-sospensjoni għal 48 siegħa;
– 4	Tahlit tal-kostitwenti kollha tan-naqal; tnehhija tal-kampjuni tan-naqal tan-naqal ittrattat u tal-kontroll bis-solvent sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; mili tal-ilma tal-madwar; inkubazzjoni fil-kundizzjonijiet tat-test;
0 (jum 28 tal-fażi tat-tehid)	Kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); trasferiment tad-dud mill-irreplikati esposti li jifdal għar-reċipjenti li fihom naqal nadif; wara 4 — 6 sigħat tnehhija tal-irreplikati għat-tehid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test; tqassim għal għar-rieda tad-dud fil-kompartimenti tat-test;
1	Tnehhija tal-irreplikati għall-kampjunar; kontroll tal-provvista tal-arja, l-imġiba tad-dud, il-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); tehid ta' kampjuni tal-ilma, in-naqal u d-dud sabiex tiġi stabbilita l-konċentrazzjoni tas-sustanza tat-test;
2	Kontroll tal-provvista tal-arja, imġiba tad-dud u temperatura;
3	L-istess bħall-jum 1;
4	L-istess bħall-jum 2;
5	L-istess bħall-jum 1;
6	L-istess bħall-jum 2;
7	L-istess bħall-jum 1; ikkumpensa għall-ilma evaporat jekk hemm bżonn;
8 — 9	L-istess bħall-jum 2;
10	L-istess bħall-jum 1; tmiem il-fażi ta' eliminazzjoni; kejl tal-kwalità tal-ilma (ara l-paragrafu 52); kampjunar tal-ilma, in-naqal u d-dud mill-kontrolli bis-solvent; kampjunar tas-soluzzjonijiet tan-nases, jekk jiġu installati.
	It-thejjija tan-naqal qabel tibda l-fażi ta' eliminazzjoni għandha ssir bl-istess mod bħal qabel il-fażi tat-tehid.
	L-attivitajiet deskritti għall-jum 2 għandhom isiru kuljum (tal-inqas fil-jiem tax-xogħol).

▼ **M6***Appendiċi 4***Ċerti karatteristiċi fiżikokimiċi ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli**

KOSTITWENTI	KONĊENTRAZZJONIJIET
Materja partikolata	< 20 mg/l
Karbonju organiku totali	< 2µg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Klorur residwu	< 10 µg/l
Perstiċidi organofosfori totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

KOMPOŻIZZJONI TAL-ILMA RIKOSTITWIT RAKKOMANDAT

(a) Soluzzjoni tal-klorur tal-kalċju

Holl 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ filma dejonizzat; zid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(b) Soluzzjoni ta' sulfat tal-manjeżju

Holl 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ filma dejonizzat; zid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(c) Soluzzjoni ta' bikarbonat tas-sodju

Holl 2,59 g NaHCO_3 filma dejonizzat; zid sa 1 l b'ilma dejonizzat

(d) Soluzzjoni tal-klorur tal-potassju

Holl 0,23 g KCl filma dejonizzat; tella' sa 1 l b'ilma dejonizzat

Is-sustanzi kimiċi kollha għandhom ikunu ta' grad analitiku.

Il-konduttività tal-ilma distillat jew dejonizzat ma għandhiex taqbeż $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Jithalltu 25 ml kull wieħed ta' soluzzjonijiet (a) sa (d) u l-volum totali li jżidied sa 1 l b'ilma dejonizzat. Is-somma tal-joni tal-kalċju u tal-manjeżju f'din is-soluzzjoni hija ta' 2,5 mmol/l.

Il-proporzjon ta' joni Ca:Mg huwa ta' 4:1 u ta' joni Na:K huwa ta' 10:1. Il-kapaċità tal-aċidu $\text{K}_{\text{S}4.3}$ ta' din is-soluzzjoni hija 0,8 mmol/l.

Żid l-arja mal-ilma dilwit sakemm tintlaħaq is-saturazzjoni tal-ossigenu, imbagħad aħżnu għal madwar jumejn mingħajr arjazzjoni ulterjuri qabel l-użu.

Il-pH ta' ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli għandha tkun fil-medda ta' 6 — 9.

▼ M6

Appendiċi 5

Naqal artifiċjali — rakkomandazzjonijiet dwar it-thejjja u l-ħżin

Għall-kuntrarju tar-rekwiżiti fil-metodu ta' ttestjar C.8 (40), huwa rakkomandat li l-kontenut tal-pit tan-naqal artifiċjali ikun ta' 2 % minflok 10 % tal-piż xott, sabiex ikun jikkorrispondi għal kontenut organiku baxx sa moderat tan-naqal naturali (58).

Il-perċentwal tal-kostitwenti nixfin tan-naqal artifiċjali:

Kostitwent	Karatteristiċi	% ta' naqal imnixxef
Pit	Pit ta' sfanju, grad ta' dekompożizzjoni: "midjum", arja mnixxfa, ma fadal ebda pjanta vizibbli, mithun fin (daqs tal-partikoli $\leq 0,5$ mm)	$2 \pm 0,5$
Ramel kwarzuż	Daqs tal-gerbub: ≤ 2 mm, iżda > 50 % tal-partikoli għandhom ikunu fil-medda ta' 50-200 μ m	76
Tafal tal-kawlina	Konteut ta' kawlina ≥ 30 %	22 ± 1
Sors tal-ikel	<i>Folia urticae</i> , weraq imfarrak ta' <i>Urtica sp.</i> (hurrieq), mithun fin (daqs tal-partikoli $\leq 0,5$ mm), jew tahlita ta' weraq imfarrak ta' <i>Urtica sp.</i> b'alfacelluloża (1: 1); skont l-istandards tal-farmaċija, għal konsum mill-bniedem; minbarra n-naqal imnixxef	0,4 — 0,5 %
Karbonat tal-kalċju	CaCO_3 , polverizzat, kimikament pur, flimkien man-naqal xott	0,05 — 1
Ilma Dejonizzat	Kondottività ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, minbarra n-naqal xott	30 — 50

Jekk ikunu mistennjin konċentrazzjonijiet għoljin tal-ammonijaka, eż. jekk is-sustanza tat-test tkun magħrufa li tinibixxi n-nitrifikazzjoni, jista' jkun utli li jiġi sostitwit 50 % tat-trab tal-hurrieq rikk fin-nitroġenu maċ-ċelluloża (eż., trab α -Celluloża, kimikament pura, daqs tal-partikoli $\leq 0,5$ mm).

Thejjja

Il-pit jitnixxef bl-arja u jiffarrak fi trab fin (daqs tal-partikoli $\leq 0,5$ mm, ma jifdal ebda pjanta vizibbli). Sospensjoni tal-ammont mehtieg ta' trab tal-pit tithejja bl-użu ta' porzjoni tal-ilma dejonizzat li trid tiddaħhal fin-naqal imnixxef (volum ta' ilma ta' $11,5 \times$ piż xott tal-pit instab li huwa utli biex tiġi prodotta sospensjoni magħquda li tista' tithallat tal-pit (8)) bl-użu ta' apparat omoġenizzanti bi prestazzjoni għolja.

Il-pH ta' din is-sospensjoni huwa aġġustat għal $5,5 \pm 0,5$ b' CaCO_3 . Is-sospensjoni hija kondizzjonata għal tal-inqas jumejn b'thawwid bil-galbu f' 20 ± 2 °C, sabiex tiġi stabbilizzata l-pH u jiġi stabbilit komponent mikrobjali stabbli. Il-pH terġa' titkejjel u tiġi aġġusta għal $6,0 \pm 0,5$ b' CaCO_3 jekk ikun hemm bżonn. Imbagħad, is-sospensjoni kollha tithallat mal-kostitwenti nixfin l-oħrajn, filwaqt li tittiehed f'kunsiderazzjoni kwalunkwe porzjon għaž-zieda. L-ilma dejonizzat li jifdal jiżdied sabiex jinkiseb naqal omoġenu. Il-pH terġa' titkejjel u tiġi aġġusta għal 6,5 sa 7,5 b' CaCO_3 jekk ikun hemm bżonn. Madankollu, jekk ikun mistenni żvilupp ta' ammonijaka, jaf ikun utli li l-pH tan-naqal jinżamm inqas minn 7,0 (eż. bejn 6,0 u 6,5). Il-kampuni tan-naqal jittiehdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku. Jekk ikun mistenni żvilupp tal-ammonijaka, in-naqal artifiċjali jista' jiġi kondizzjonat għal sebat ijiem fl-istess kundizzjonijiet li jkunu prevalenti fit-test sussegwenti (eż. proporzjon ta' naqal-ilma 1: 4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test) qabel tiżdied is-sustanza tat-test miegħu, jiġifieri għandu jimtela' bl-ilma, li għandu jingħata l-arja. Fi tmien il-perjodu ta' kondizzjonament, l-ilma tal-madwar għandu jitneħħa u jintrema. Il-kampjuni tan-naqal jittiehdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-kontenut ta' karbonju organiku totali (eż. 3 kampjuni).

▼ M6

Wara, ir-ramel kwarzuż miżjud jithallat man-naqal għal kull livell tat-trattament, in-naqal jitqassam fir-reċipjenti tat-test tal-irreplikati, u jimtela bl-ilma tat-test (eż. proporzjon ta' naqal-ilma ta' 1: 4, għoli tas-saff tan-naqal bħal fir-reċipjenti tat-test). Imbagħad ir-reċipjenti jiġu inkubati fl-istess kundizzjonijiet li jkunu prevalenti fit-test sussegwenti. Dan huwa fejn jibda il-perjodu ta' ekwilibriju. L-ilma tal-madwar għandu jingħata l-arja.

Is-sors tal-ikel magħżul għandu jiddahhal qabel jew meta s-sustanza tat-test tkun qed tiżdied man-naqal. Għall-ewwel jista' jithawwad mas-sospensjoni tal-pit (ara iktar 'il fuq). Madankollu, degradazzjoni eċċessiva tas-sors tal-ikel qabel ma jiddahhlu l-organizmi tat-test — eż. fil-każ ta' perjodu ta' ekwilibrazzjoni twila — tista' tiġi evitata billi l-perjodu ta' żmien bejn it-tidhila tal-ikel u l-bidu tal-espożizzjoni jinżamm qasir kemm jista' jkun. Sabiex jiġi żgurat li l-ikel ikollu biżżejjed kuntatt mas-sustanza tat-test, is-sors tal-ikel għandu jithawwad man-naqal mhux iktar tard minn dakinhar li s-sustanza tat-test tiżdied man-naqal. Eċċezzjonijiet jistgħu jkunu meta t-tul tal-perjodu ta' ekwilibrazzjoni jista' jwassal għal degradazzjoni mikrobjali eċċessiva tal-ikel qabel ma jiddahhlu l-organizmi tat-test. Il-kampjuni tan-naqal jittiehdu sabiex jiġi stabbilit il-piż xott u l-karbonju organiku totali (eż. 3 kampjuni ta' naqal miżjud jew bil-kontroll).

Il-piż xott tal-komponenti (pit, ramel, kawlina) għandu jiġi rrapportat fi g u f'perċentwal tal-piż xott totali.

Il-volum ta' ilma li għandu jiddahhal fil-komponenti nixfin matul it-thejjija tan-naqal għandu jiġi rrapportat f'perċentwal tal-piż xott totali wkoll (eż. 100 % piż xott + 46 % ilma tfisser 1 000 g d.w. jirċievu total ta' 460 ml ilma, li jirriżulta f'1 460 g naqal imxarrab).

Hżin

Il-kostitwenti nixfin tan-naqal artifiċjali jistgħu jinħażnu f'post xott u biered f'temperatura ambjentali. In-naqal imħejji u mxarrab jista' jinħażen (għal użu ulterjuri fil-koltura biss) f'4 ± 2 °C fid-dlam għal perjodu ta' bejn ġimgħatejn u ebra' ġimgħat minn dakinhar tat-thejjija (8).

In-naqal miżjud bis-sustanza tat-test għandu jintuża mill-ewwel sakemm ma jkunx hemm informazzjoni li tindika li n-naqal partikolari jista' jinħażen mingħajr ma jkunu affettwati t-tossicità u l-bijodisponibilità tas-sustanza tat-test. Il-kampjuni tan-naqal miżjud jistgħu jinħażnu fil-kundizzjonijiet irrakkomandati għas-sustanza tat-test partikolari analizzata.

▼ M6

Appendiċi 6

Speċijiet ta' oligoċaeti rakkomandati għall-ittestjar tal-bijoakkumulazzjoni***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificiċi, Oligoċaeta**

L-oligoċaeti tubificiċi (Tubificiċi, Oligoċaeti) *Tubifex tubifex* (Müller) jgħixu fin-naqal tal-ilma helu ftubi li fihom linja mukus. F'dawn it-tubi, id-dud jgħix rasu 'l isfel, u jingesti partikoli tan-naqal billi juża l-mikroorganizmi assoċjati u f'dalijiet organiċi. Il-porzjon ta' wara normalment jidhol fl-ilma tal-madwar għal skopijiet ta' tehid tan-nifs. Għad li din l-ispeċi tgħix f'medda wiesgħa ta' tipi ta' naqal madwar l-emisfera tat-Tramuntana kollha, *Tubifex tubifex* tippreferi daqsi-jiet tal-hbub relattivament fini (59). L-idoneità ta' din l-ispeċi għall-ittestjar ekotossikologiku hija deskritta pereżempju fi (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63).

Metodi tal-koltura

Sabiex ikun hemm numru suffiċjenti ta' *Tubifex tubifex* sabiex isiru testijiet tal-bijoakkumulazzjoni, id-dud irid jinżamm f'koltura tal-laboratorju permanenti. Sistema li tikkonsisti f'naqal artifiċjali fuq il-bażi tal-hamrija artifiċjali skont il-Metodu ta' Ttestjar C.8 (4) u ilma rikostitwit skont il-metodu ta' ttestjar C.1 hija rakkomandata għall-koltura ta' *T. tubifex* (8).

Kontenituri tal-ħgieg jew l-azzar inossidabbli b'għoli ta' 12 sa 20 cm jistgħu jintużaw bħala reċipjenti tal-koltura. Kull kontenitur tal-koltura jmtela b'saff naqal artifiċjali mxarrab kif deskritt fl-Appendiċi 5. Il-fond tas-saff tan-naqal għandu jippermetti sabiex id-dud iġib ruhu b'mod naturali meta jħaffer (tal-inqas 2 cm fond għal *T. tubifex*). L-ilma rikostitwit jiddaħhal fis-sistema. Għandha tingħata attenzjoni sabiex in-naqal ma jiġix disturbat kemm jista' jkun. Il-korp tal-ilma jingħata ftit arja (eż. 2 bżieqaq fis-sekonda b'arja ffiltrata b'0,45 µm) permezz ta' pipetta pasteur imqiegħda 2 cm 'il fuq mill-wieċ tan-naqal. It-temperatura rakkomandata tal-koltura hija ta' 20 ± 2 °C.

Id-dud jiddaħhal fis-sistema tal-koltura b'tagħbija massima ta' 20 000 individwu/m² superfiċje tan-naqal. Tagħbija ikbar tista' tikkaguna tnaqqis fir-rati ta' tkabbir u riproduzzjoni (43).

F'kolturi tan-naqal artifiċjali, id-dud irid jintema'. Dieta li tikkonsisti f'ikel tal-hut mithun fin, eż. TetraMin® tista' sservi bħala nutrizzjoni addizzjonali (8); Klerks 1994, komunikazzjoni personali. Ir-rati tat-tmigh għandhom jippermettu tkabbir u riproduzzjoni suffiċjenti u għandhom iżommu l-akkumulazzjoni ta' ammonijaka u tkabbir fungali fil-koltura baxxi kemm jista' jkun. L-ikel jista' jingħata darbtejn fil-gimgha (eż. 0,6 — 0,8 mg kull cm² superfiċje tan-naqal). L-esperjenza pratika għallmet li l-applikazzjoni ta' ikel sospiż u omoġenizzat filma dejonizzat tista' thaffef id-distribuzzjoni omoġena tal-ikel fil-wieċ tan-naqal fil-kontenituri tal-koltura.

Biex tiġi evitata l-akkumulazzjoni tal-ammonijaka, l-ilma tal-madwar għandu jinbidel bl-użu ta' sistema bi fluss kontinwu, jew, tal-inqas darba fil-gimgha, b'mod manwali. In-naqal għandu jinbidel kull tliet xhur fil-kolturi tal-istokk.

Il-kampjunar tad-dud mill-koltura jista' jsir billi n-naqal tal-koltura jingħadda minn passatur ta' 1 mm jekk huma mehtieġa biss l-adulti. Għaż-żamma tal-fosdqiet tal-larva, xieraq li tintuza xibka ta' 0,5 mm, u għad-dud żgħir passatur ta' 0,25 mm. Il-passaturi jistgħu jitqiegħdu f'ilma rikostitwit wara li jkun ingħadda n-naqal minn go fih. Id-dud iħalli x-xibka u mbagħad jista' jingabar mill-ilma bl-użu ta' forċipi tal-azzar hafif jew pipetta bi truf illostrati bil-fjamma.

▼ M6

Jintużaw biss kampjuni ta' *Tubifex tubifex* intatti u identifikati biċ-ċar (eż. (64)) sabiex jinbdew test jew kulturi ġodda. Dud marid jew korrot kif ukoll fosdqi tal-larva infestati b'ifa fungali jridu jintremew.

Koltura sinkronizzata tista' tipprovdi dud ta' età speċifika f'intervalli xierqa meta jkun hemm bżonn. Reċipjenti ġodda tal-koltura jiġu stabbiliti fl-intervalli magħżulin (eż. kull ġimgħatejn), u l-ewwel jibdwu annimali ta' ċerta età (eż. fosdqa tal-larva). Fil-kundizzjonijiet tal-koltura deskritti hawnhekk, id-dud isir adult wara 8 — 10 ġimgat. Il-kulturi jistgħu jiġabru meta d-dud ikun b'ed fosdqi ġodda, eż. wara għaxart ijiem. L-adulti fil-kampjun jistgħu jintużaw għat-testijiet, u jistgħu jinbdew kulturi ġodda bil-fosdqi tal-larva.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbrikulida, Oligochaeta**

Anki *lumbriculus variegatus* (Lumbrikulidi, Oligochaeta) tgħix f'naqal tal-ilma hekk madwar id-dinja u jintuża hekk f'testijiet ekotossikoloġiku. Informazzjoni dwar il-bijoloġija, il-kundizzjonijiet tal-koltura, u s-sensittività tal-ispeċijiet tista' tinkiseb minn (1)(6)(9)(36). *Lumbriculus variegatus* tista' tiġi kulturata wkoll fin-naqal artifiċjali rrakkomandat għal *T. tubifex* skont (8) fi hdan ċerti limitazzjonijiet. Peress li, fin-natura tagħha, *L. variegatus* tippreferi naqal iktar aħrax minn *T. tubifex* (59), il-kulturi tal-laboratorju bin-naqal artifiċjali użati għal *T. tubifex* jistgħu jieqfu wara 4 sa 6 xhur. L-esperjenza Prattika wriet li *L. variegatus* tista' tinżamm f'substrat ramli (eż. ramel kwarzuż, żrar fin) f'sistema bi fluss kontinwu bl-użu ta' ikel tal-hut bħala sors nutrizzjonali tul bosta snin bla tiġdid tas-substrat. Vantaġġ kbir ta' *L. variegatus* meta mqabbla ma' speċijiet oligochaeta akkwatiċi huwa r-riproduzzjoni veloċi tagħha, li tirriżulta f'bijomassa li tizdied malajr hekk f'popolazzjonijiet kulturati fil-laboratorju (1)(6)(9)(10).

Metodi tal-koltura

Il-kundizzjonijiet tal-koltura għal *Lumbriculus variegatus* huma spjegati f'dettall f'Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Hawn taht jingħata sommarju qasir ta' dawn il-kundizzjonijiet.

Id-dud jista' jiġi kulturat f'akkwarji kbar (57 — 80 l) fi 23 °C b'fotoperjodu ta' 16L:8D (100 — 1 000 lux) bl-użu ta' ilma naturali mġedded kuljum (45 — 50 l għal kull akkwarju). Is-substrat jittejjja bi qtugħ ta' karti kannella mhux ibbliċjati fi strixxi, li mbagħad jistgħu jithalltu mal-ilma tal-koltura għal ftit sekondi biex jirriżultaw f'biċċiet żgħir ta' substrat tal-karta. Imbagħad dan is-substrat jista' jintuża fl-akkwarji tal-koltura ta' *Lumbriculus* billi jgħatti ż-żona tal-qiegħ tat-tank, jew inkella jinħażen iffrizat filma dejonizzata sabiex jintuża iktar tard. Generalment, substrat ġdid fit-tank idur madwar xahrejn.

Kull koltura tad-dud tinbeda b'500 — 1 000 dudu, u tintema' sospensjoni ta' 10 ml li fiha 6 g ikel tal-bidu għat-troki 3 darbiet fil-ġimgħa f'kundizzjonijiet ta' tiġdid jew bi fluss kontinwu. Kulturi statiki jew semistatiki għandhom jirċievu rati inqas ta' tmigh biex jiġi evitat it-tkabbir batterjali u fungali. Is-substrat tal-karta u l-ikel għandu jiġi analizzat għas-sustanzi li għandhom jintużaw fit-testijiet tal-bioakkumulazzjoni.

F'dawn il-kundizzjonijiet, in-numru ta' individwi fil-koltura generalment jirdoppja f'madwar 10 sa 14-il jum.

Lumbriculus variegatus tista' titneħħa mill-kulturi eż. billi s-substrat jiġi ttrasferit f'xibka b'malja fina, jew organiżmi li jużaw pipetta tal-ħgieg b'toqba wiesgħa llostrata bil-fjamma (dijametru ta' madwar 5 mm), f'bekk separat. Jekk is-substrat jiġi kotrasferit f'dan il-bekk, il-bekk li fih id-dud u s-substrat jithalla f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu lejli shih, u dan ser inehhi s-substrat mill-bekk, filwaqt

▼ M6

li d-dud jibqa' fil-qiegh tar-reċipjent. Imbagħad jista' jiddaħħal f'tankijiet tal-koltura mhejjin godda, jew ikompli jiġi pproċessat għat-test kif spjegat f'(1) u (6). Korrimenti jew awtotomija fid-dud għandhom jiġu evitati, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illostrati bil-fjamma, jew maqbad tal-azzar inossidabbli għat-tqandil ta' dan id-dud.

Problema li trid titqies b'mod kritiku meta tintuża *L. variegatus* f'testijiet tal-bjoakkumulazzjoni tan-naqal hija l-modalità ta' riproduzzjoni tagħha (arkitomija segiwta mill-morfallassi). Din ir-riproduzzjoni asesswali tirriżulta f'żewġ frammenti, li ma jiklux għal ċertu perjodu sakemm tiġi rigenerata l-parti tar-ras jew tad-denb (eż. (36)(37)). Dan ifisser li *L. variegatus* it-tehid ta' naqal u inkwinanti bl-ingestjoni jaf ma jseħx kontinwament bħal f'tubificidi, li ma jirriproduċux bi frammentazzjoni.

Għalhekk, għandha ssir sinkronizzazzjoni biex jiġu minimizzati r-riproduzzjoni u r-rigenerazzjoni bla kontroll, u l-varjazzjoni kbira sussegwenti fir-riżultati tat-test. It-tali varjazzjoni tista' ssehh, meta ċerti individwi, li jkunu fframmentaw u għaldaqstant ma jiklux għal ċertu perjodu ta' żmien, ikunu esposti inqas għas-sustanza tat-test meta mqabbla ma' individwi oħrajn, li ma jifframmentawx matul it-test, eż. (38). 10 sa 14-il jum qabel ma tibda l-espożizzjoni, id-dud għandu jiġi frammentat b'mod artifiċjali (sinkronizzazzjoni) (65). Għandu jintuża dud kbir, li idealment ma għandux ikollu marki ta' frammentazzjoni riċenti. Dan id-dud jista' jitqiegħed fuq slide tal-ħġieġ f'qatra ilma tal-koltura, u jiġi dissezżjonat fir-reġjun medjan tal-ġisem b'sikkina kirurġika. Għandha tingħata attenzjoni li t-truf ta' wara jkunu ta' daqs simili. It-truf ta' wara mbagħad għandhom jithallew jirrigeneraw irjus godda f'reċipjent tal-kultura li fih l-istess sottostrat kif użat fil-kultura u l-ilma rikostitwit sal-bidu tal-espożizzjoni. Ir-rigenerazzjoni ta' rjus godda hija indikata meta d-dud sinkronizzat ikun qiegħed iħaffer fis-sottostrat (il-preżenza ta' rjus rigenerati tista' tiġi kkonfermata bl-ispezzjoni ta' sottokampjun rappreżentattiv taħt mikroskopju binokulari). Wara, l-organizmi tat-test ikunu mistennija li jkunu fi stat fiżjologiku simili. Dan ifisser li meta r-rigenerazzjoni bil-morfallassi ssehh f'dud sinkronizzat matul it-test, prattikament l-annimali kollha jkunu mistennija jkunu esposti bl-istess mod għan-naqal miżjud. It-tmigh tad-dud sinkronizzat għandu jsir malli d-dud jibda jħaffer fis-substrat, jew 7 ijiem wara d-dissezżjoni. L-iskema tat-tmigh għandha tkun paragunabbli mal-kolturi regolari, iżda jista' jkun rakkomandat li d-dud sinkronizzat jintema mal-istess sors tal-ikel bħal kif jintuża fit-test. Id-dud għandu jinżamm f'temperatura tat-test, 20 ± 2 °C. Wara r-rigenerazzjoni, għat-test għandu jintuża dud shiħ intatt ta' daqs simili li jkun qiegħed jgħum jew jitkaxkar b'mod attiv fuq stimolu mekkaniku hafif. Korrimenti jew awtotomija fid-dud għandhom jiġu evitati, eż. billi jintużaw pipetti bi truf illostrati bil-fjama, jew maqbad tal-azzar inossidabbli għat-tqandil ta' dan id-dud.

Meta tintuża *Lumbriculus variegatus* fit-test, minhabba l-modalità ta' riproduzzjoni speċifika ta' din l-ispeċi, għandha ssehh żieda fin-numru ta' dud matul it-test jekk il-kundizzjonijiet ikunu xierqa (6). Għandu jiġi rreġistrat nuqqas ta' riproduzzjoni f'test tal-bjoakkumulazzjoni b'*L. variegatus*, u dan irid jiġi kkunsidrat meta jiġu interpretati r-riżultati tat-test.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidi, Oligochaeti (mhux ivvalidati fir-ringtest)**

Branchiura sowerbyi tgħix f'firxa ta' tipi ta' naqal ta' riżervi, lagi, għadajjar u xmajjar, u oriġinarjament f'żoni tropikali. Tista' tinstab ukoll f'korpi tal-ilma shiħ fl-emisfera tat-Tramuntana. Madankollu, hija iktar abbondanti f'naqal tafli u bit-tajn b'kontenut għoli ta' materja organika. Barra minn hekk, id-dud jgħix fis-saff

▼ M6

tan-naqal. Anki l-parti ta' wara tad-dud normalment tkun fil-hofo. Din l-ispeċi malajr tingharaf minhabba l-filamenti tal-gargi fuq in-naha ta' wara taghha. L-adulti jistgħu jilhqg tul ta' 9 -11-il cm u piż imxarrab ta' 40-50 mg. Id-dud għandu rata għolja ta' riproduzzjoni, juri żminijiet ta' rdoppjar ta' popolazzjoni ta' inqas minn ġimghatejn u fil-kundizzjonijiet tat-temperatura u t-tmigh deskritti hawn taht (Aston et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* ntuzat kemm fi studji tat-tossiċità kif ukoll dawg tal-bijoakkumulazzjoni (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, (67) rispettivamente).

Metodi tal-koltura

Hawn taht jingħata sommarju tal-kundizzjonijiet tal-koltura għal *Branchiura sowerbyi* (ipprovdut minn Mercedes R. Marchese, INALI, l-Argentina, u Carla J. Roghair, RIVM, Il-Pajjiżi l-Baxxi).

Ma hemm bżonn ta' ebda teknika unika għall-koltura tal-organizmi tat-test. L-organizmi jistgħu jiġu kulturati bl-użu ta' naqal naturali u mhux kontaminat (31). L-esperjenza Prattika għallmet li midjum li jikkonsisti f'naqal naturali u ramel itejjeb il-kundizzjoni tad-dud meta mqabbel ma' naqal naturali pur (32)(67). Għall-koltura jistgħu jintużaw bekkijiet ta' 3 L li fihom 1 500 ml midjum ta' naqal/ilma, u li jikkonsistu f'375 ml naqal naturali mhux kontaminat (madwar 10 % tal-Karbonju Organiku totali; madwar 17 % tal-partikoli $\leq 63 \mu\text{m}$), 375 ml ramel nadif (M32), u 750 ml ilma tal-vit rikostitwit jew deklorat (31)(32)(67). Jistgħu jintużaw ukoll karti bħala substrat għall-koltura, iżda t-tkabbir tal-popolazzjoni jkun inqas milli f'naqal naturali. F'sistemi semistatiċi s-saff tal-ilma fil-bekk jingħata ftit arja, u l-ilma tal-madwar għandu jiġġedded darba fil-ġimgha.

Kull bekk ikun fih 25 dudu żgħir għall-ewwel. Wara xahrejn, id-dud il-kbir jittiehed min-naqal bil-pinzetta u jitqiegħed f'bekk ġdid b'midjum ta' naqal/ilma magħmul ġdid. Il-bekk il-qadim fih fosdqi u dud żgħir ukoll. B'dan il-mod jistgħu jingħabru sa 400 dudu żgħir għal kull bekk. Id-dud adult jista' jintuża għar-riproduzzjoni għal tal-inqas sena.

Il-kolturi għandhom jinżammu f'temperatura ta' 21 sa 25 °C. Il-varjazzjoni tat-temperatura għandha tinżamm għal inqas minn ± 2 °C. Iz-żmien mehtieg għall-iżvilupp embrijoniku minn meta bajda titbied sakemm iż-żgħar iħallu l-fosdqa huwa ta' madwar tliet ġimghat f'25 °C. Instab li l-produzzjoni tal-bajd miksuba għal kull dudu li jibqa' haj f'*B. sowerbyi* kienet tvarja bejn 6,36 (31) u 11,2 (30) fit-tajn f'25 °C. In-numru ta' bajd għal kull fosdqa varja bejn 1,8 u 2,8 (66)(69) jew anki wasal sa 8 (68).

L-ossigenu dissolt, l-ebusija tal-ilma, it-tempratura, u l-pH għandhom jitkejlu darba fil-ġimgha. L-ikel tal-hut (eż. TetraMin®) jista' jiddaħhal bħala sospensjoni darbtejn jew tliet darbiet fil-ġimgha ad libitum. Id-dud jista' jintema wkoll hass li jithalla joqghod *ad libitum*.

Vantaġġ kbir ta' din l-ispeċi huwa l-bijomassa individwali għolja (sa 40 — 50 mg piż imxarrab għal kull individwu). Għalhekk, din l-ispeċi tista' tintuża għall-ittejtjar tal-bijoakkumulazzjoni ta' sustanzi tat-test mhux radjutikkettati. Tista' tiġi esposta fis-sistemi użati għal *T. tubifex* jew *L. variegatus* b'individwu wiehed għal kull irreprikat (11). Madankollu, imbagħad għandha tizdied ir-replikazzjoni, sakemm ma jintużawx kompartimenti tat-test ikbar (11). Barra minn hekk, il-kriterju tal-validità marbut mal-imġiba tat-thaffir irid jiġi aġġustat għal din l-ispeċi.

▼ **M6**

LETTERATURA

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volum 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) Il-Kummissjoni Ewropea (KE) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Uffiċċju tal-Pubblikazzjonijiet tal-Unjoni Ewropea tal-Komunitajiet Ewropej, il-Lussemburgu.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Il-Kapitolu C.13 ta' dan l-Anness, Test tal-Bijokonċentrazzjoni tal-Hut bi Fluss Kontinwu.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) Il-Kapitolu C.27 ta' dan l-Anness, Test tat-tossicità tal-Kironomidi tal-ilma-naqal bl-użu ta' naqal miżjud
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.
- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.

▼ **M6**

- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/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
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.
- (20) 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.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) Il-kapitolu li ġejjin ta' dan l-Anness:
 - Il-Kapitolu A.4, pressjoni tal-fwar
 - Il-Kapitolu A.5, Tensjoni tas-superfiċje
 - Il-Kapitolu A.6, Solubilità fl-ilma
 - Il-Kapitolu A.8, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu tal-flask mhežżeż
 - Il-Kapitolu A.24, Koeffiċjent ta' partizzjoni, metodu HPLC
 - Il-Kapitolu C.7, degradazzjoni — degradazzjoni abijotika: idrolizi bħala funzjoni tal-pH
 - Il-Kapitolu C.4 A-F Determinazzjoni tal-bijodegradabilità lesta
 - Il-Kapitolu C.19, Stima tal-koeffiċjent ta' assorbiment (K_{oc}) fuq il-hamrija u fuq il-hama tad-drenaġġ bl-użu ta' kromatografija bi prestazzjoni għolja tal-likwidu (HPLC)
 - Il-Kapitolu C.29, CO₂ tal-bijodegradabilità lesta freċipjenti ssigillati
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165-172.

▼ **M6**

- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehnecke & G. Studinger (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.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness, Hut, Test tat-Tossicità Akuta.
- (34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.

▼ **M6**

- (40) Il-Kapitolu C.8 ta' dan l-Anness, Tossicità għall-Hanex.
- (41) Environment Canada (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.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micro-methods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.
- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) 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 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991) Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.

▼ **M6**

- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274.

▼ M7

C.47. TEST TAT-TOSSICITÀ FI STADJU BIKRI TAL-HAJJA TAL-HUT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 210 tal-OECD (2013). It-testijiet fl-istadji bikrija tal-hajja tal-hut huma maħsuba biex jiddefinixxu l-effetti letali u subletali tas-sustanzi kimiċi fuq l-istadji u l-ispeċijiet ittestjati. Huma jrendu informazzjoni ta' valur għall-istima tal-effetti letali u subletali kroniċi tas-sustanza kimika fuq speċijiet ta' hut oħrajn.
2. Il-linja gwida tat-test 210 hija bbażata fuq proposta mir-Renju Unit li giet diskussa fl-aqgħa ta' esperti tal-OECD li saret f'Medmenham (ir-Renju Unit) f'Novembru 1988 u li kompliet tiġi aġġornata fl-2013 sabiex tkun tirrifletti l-esperjenza fl-użu tat-test u r-rakkomandazzjonijiet minn sessjoni ta' hidma tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossicità tal-hut, li giet organizzata f'Settembru 2010 (1).

IL-PRINCIPJU TAT-TEST

3. L-istadji bikrija tal-hajja tal-hut huma esposti għal firxa ta' konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test mahlula fl-ilma. Huma ppreferuti kundizzjonijiet bi fluss kontinwu; madankollu, jekk dawn ma jkunux possibbli, huma aċċettabbli wkoll kundizzjonijiet semistatiċi. Għad-dettalji, għandu jiġi kkon-sultat id-dokument ta' gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossicità akwatika ta' sustanzi u tahlitiet diffiċli (2). It-test jinbada billi l-bajd fertilizzat jitqiegħed f'kompartimenti tat-test u jitkompla għal perjodu ta' żmien speċifiku għall-ispeċi li huwa neċessarju sabiex il-hut taht kontroll jilhaq stadju bikri tal-hajja. L-effetti letali u subletali jiġu vvalutati u mqabbla mal-valuri tal-kontroll sabiex tiġi ddeterminata l-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) jew (i) il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) u/jew (ii) l- EC_x (eż. EC_{10} , EC_{20}) permezz ta' mudell ta' rigressjoni sabiex tiġi stmata l-konċentrazzjoni li tikkawża bidla ta' x % fl-effett imkejjel. Ir-rappurtar tal-konċentrazzjonijiet tal-effett u l-parametri rilevanti jista' jiddependi fuq il-qafas regolatorju. Il-konċentrazzjonijiet tat-test għandhom jibbrakitjaw l- EC_x biex b'hekk l- EC_x tohrog mill-interpolazzjoni aktar milli mill-estrapolazzjoni (ara l-Appendiċi 1 għad-definizzjonijiet).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

4. Is-sustanza kimika tat-test tirreferi għal dak li qed jiġi ttestjat. Għandhom ikunu magħrufa s-solubbiltà fl-ilma (ara l-kapitolu A.6 ta' dan l-Anness) u l-pressjoni tal-fwar (ara l-kapitolu A.4 ta' dan l-Anness) tas-sustanza kimika tat-test u għandu jkun disponibbli metodu analitiku affidabbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika fis-soluzzjonijiet tat-test bi preċiżjoni u limitu ta' kwantifikazzjoni magħrufa u rappurtati. Għalkemm mhuwiex neċessarju li jsir it-test, ir-rizultati minn test tat-tossicità akuta (ara l-kapitolu C.1 jew C.49 ta' dan l-Anness), preferibbilment imwettaq bl-ispeċijiet magħzula għal dan it-test, jistgħu jipprovdu informazzjoni siewja.
5. Jekk il-metodu ta' ttestjar jintuża għall-ittestjar ta' tahlita, il-kompożizzjoni tagħha għandha tiġi kkaratterizzata kemm jista' jkun possibbli, pereżempju, mill-identità kimika tal-kostitwenti tagħha, l-okkorrenza kwantitattiva tagħhom u l-proporzjonijiet speċifiċi għas-sustanzi tagħhom (bħal dawk imsem-mija fuq). Qabel jintuża l-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar regolatorju ta' tahlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk dan huwiex ser jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-iskop regolatorju maħsub.
6. L-informazzjoni siewja tinkludi l-formula strutturali, il-purità tas-sustanza, is-solubbiltà fl-ilma, l-istabilità fl-ilma u fid-dawl, il- pK_a , il- P_{ow} u r-rizultati ta' test għall-bijodegradabilità immedjata (pereżempju, il-kapitolu C.4 jew C.29 ta' dan l-Anness).

▼ **M7****IL-VALIDITÀ TAT-TEST**

7. Sabiex test ikun validu japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:
- Il-konċentrazzjoni tal-ossigenu dissolt għandha tkun $> 60\%$ tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;
 - it-temperatura tal-ilma ma għandhiex tvarja b'aktar minn $\pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bejn il-kompartimenti tat-test jew bejn il-jiem suċċessivi fi kwalunkwe hin matul it-test u għandha tinżamm fi hdan il-meded tat-temperaturi speċifikati għall-ispeċi tat-test (Appendiċi 2);
 - Il-kejl analitiku tal-konċentrazzjonijiet tat-test huwa obligatorju.
 - is-sopravivenza ġenerali tal-bajd fertilizzat u s-suċċess fil-kontrolli wara t-tifqis u, fejn rilevanti, fil-kontrolli tas-solventi, għandhom ikunu akbar minn jew daqs il-limiti definiti fl-Appendiċi 2.
8. Jekk tiġi osservata devjazzjoni żgħira mill-kriterji tal-validità, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tad-dejta tat-test u dawn il-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapport. L-effetti fuq is-sopravivenza, it-tifqis jew it-tkabbir li jsehhu fil-kontroll tas-solvent, meta mqabbel mal-kontroll negattiv, għandhom jiġu rrapportati u diskussi fil-kuntest tal-affidabbiltà tad-dejta tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Kompartimenti tat-test**

9. Jistgħu jintużaw reċipjenti tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli jew ta' kwalunkwe materjal kimikament inerti ieħor. Billi s-silikon huwa magħruf bħala li għandu kapacià qawwija li jassorbi sustanzi lipofiliċi, l-użu ta' tubi tas-silikon fi studji bi fluss kontinwu u l-użu ta' sigilli tas-silikon f'kuntatt mal-ilma għandhom jitnaqqsu bl-użu ta', pereżempju, akkwariji ta' ħġieġ magħmul minn blokk waħda. Id-dimensjonijiet tar-reċipjenti għandhom ikunu kbar biżżejjed sabiex jippermettu tkabbir xieraq fil-kontroll, iż-żamma tal-konċentrazzjoni ta' ossigenu dissolt (pereżempju, għall-ispeċijiet ta' hut żgħir, din tista' tinkiseb b'tank b'volum ta' 7 litri) u l-konformità mal-kriterji tar-rata tat-tagħbija msemmija fil-paragrafu 19. Idealment, il-kompartimenti tat-test jitqiegħdu f'pożizzjoni għal għarrieda fiż-zona tat-test. Disinn bi blokki aleatorji b'kull trattament preżenti f'kull blokk huwa ppreferut minn disinn kompletament aleatorju. Il-kompartimenti tat-test għandhom ikunu protetti minn disturbanza mhux mixtieqa. Preferibbilment, is-sistema tat-test għandha tiġi kkondizzjonata bil-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għal tul ta' żmien suffiċjenti sabiex ikunu jistgħu jintwerew konċentrazzjonijiet ta' esponiment stabbli qabel l-introduzzjoni tal-organizmi tat-test.

Għażla ta' speċijiet

10. L-ispeċijiet ta' hut irrakkomandati huma mogħtija fit-Tabella 1. Dan ma jeskludix l-użu ta' speċijiet oħrajn, iżda jista' jkun li l-proċedura tat-test ikollha tiġi adatta sabiex ttiprovdi kundizzjonijiet tat-test addattati. F'dan il-każ, ir-raġuni li tiġġustifika l-għażla tal-ispeċi u l-metodu sperimentali għandhom ikunu magħrufa.

Iż-żamma tal-hut riproduttiv

11. Id-dettalji dwar iż-żamma tal-istokk riproduttiv taht kundizzjonijiet sodisfacenti jistgħu jinstabu fl-Appendiċi 3 u fir-referenzi ċċitati (3)(4)(5).

It-trattament tal-bajd iffertilizzat, tal-embrijuni u tal-larvi

12. Fil-bidu, il-bajd iffertilizzat, l-embrijuni u l-larvi jistgħu jiġu esposti f'reċipjenti iżgħar tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli fi hdan ir-reċipjent ewlieni, mghammin bi xbieki fil-ġenb jew fit-truf biex ikun hemm fluss tas-soluzzjoni tat-test mir-reċipjent. Fluss kontinwu mhux turbolenti f'dawn ir-reċipjenti żgħar

▼ **M7**

jista' jiġi indott billi jiġu sospizi minn ferġha mqiegħda biex ir-reċipjent jiċċaqlaq 'il fuq u 'l isfel, iżda l-organizmi għandhom dejjem jinżammu mgħaddsin. Il-bajd iffertilizzat ta' hut salmonidu jista' jiġi sistemmat fuq xkafef jew xbieki b'fethiet kbar biżżejjed li jippermettu lil-larvi jgħaddu minnhom wara li jfaqqsu.

13. Meta jkunu intużaw kontenituri tal-bajd, grilji jew xbieki biex il-bajd jinżamm fir-reċipjent ewlieni tat-test, dawn ir-restrizzjonijiet għandhom jitnehhew wara li jfaqqsu l-larvi, skont il-gwida pprovduta fl-Appendiċi 3, hlief li x-xbieki għandhom jinżammu biex jiġi evitat li l-larva tahrab. Jekk ikun hemm bżonn li jiġu ttrasferiti l-larvi, dawn ma għandhomx ikunu esposti għall-arja u ma għandhomx jintużaw xbieki biex il-larvi jinhelsu mill-kontenituri tal-bajd. It-twaqqit ta' dan it-trasferiment ivarja skont l-ispeċijiet u għandu jiġi ddokumentat fir-rapport. Madankollu, mhux dejjem ikun neċessarju li jsir trasferiment.

Ilma

14. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwati fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test (ara l-Appendiċi 4). Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Sabiex jiġi żgurat li l-lima tad-dilwizzjoni mhuwiex ser ikollu influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test (pereżempju b'kumplessazzjoni tas-sustanza kimika tat-test) jew jaffettwa b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk riproduttiv, għandhom jittiehdu kampjuni f'intervalli għal analizi. Għandu jsir il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), l-ammonja, il-pestiċidi klorini residwi totali, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospizi, pereżempju, fuq bażi biennali meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li huwa relattivament kostanti fil-kwalità. Jekk l-ilma jkun magħruf li huwa ta' kwalità varjabbli, il-kejl għandu jsir aktar ta' spiss; il-frekwenza tiddependi fuq kemm il-kwalità tkun varjabbli. Fl-Appendiċi 4 jissemmew xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma tad-dilwizzjoni aċċettabbli.

Is-soluzzjonijiet tat-test

15. Għat-testijiet bi fluss kontinwu, hija mehtieġa sistema li tiddistribwixxi u tiddilwixxi b'mod kontinwu soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (pereżempju, pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) sabiex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-ilma tad-dilwizzjoni għandhom jiġu kkontrollati f'ċerti intervalli matul it-test u ma għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Instab li rata tal-fluss ekwivalenti għal mill-inqas ħames volumi tal-kompartimenti tat-test kull 24 siegħa hija xierqa (3). Madankollu, jekk ir-rata tat-tagħbija speċifikata fil-paragrafu 19 tigi rrispettata, rata ta' fluss aktar baxxa ta', pereżempju, 2-3 volumi tal-kompartimenti tat-test tkun possibbli sabiex jiġi evitat li l-ikel jitneħħa malajr.
16. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħzula jiġu preparati billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Preferibbilment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tithejja sempliċement billi s-sustanza kimika tat-test tithallat jew tiġi aġitata filma tad-dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. thawwid u/jew ultrasunikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni ta' saturazzjoni (kolonni tas-solubilità) jew metodi ta' dożaġġ passiv (6) sabiex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. L-użu ta' portatur ta' solvent mhuwiex rakkomandat. Madankollu, f'każ li jkun hemm bżonn ta' solvent, fl-istess hin għandu jsir kontroll tas-solvent, fl-istess konċentrazzjoni tas-solvent bħat-trattamenti kimiċi; i.e. preferibbilment, il-livell tas-solvent għandu

▼ **M7**

jkun ugwali fil-konċentrazzjonijiet kollha, kif ukoll fil-kontroll tas-solvent. Għal xi sistemi ta' dilwitur, dan jista' jkun teknikament diffiċli; hawnhekk, il-konċentrazzjoni tas-solvent fil-kontroll tas-solvent għandha tkun daqs l-ogħla konċentrazzjoni tas-solvent fil-grupp tat-trattament. Għal sustanzi li diffiċli jiġu ttestjati, għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru. 23 dwar l-ittestjar tat-tossicità akwatika ta' sustanzi u taħlitiet diffiċli (2). Jekk jintuza solvent, l-għażla tas-solvent tiġi ddeterminata mill-proprietajiet kimiċi tas-sustanza. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru. 23 jirrakkomanda konċentrazzjoni massima ta' 100 µl/l. Sabiex jiġi evitat l-effett potenzjali tas-solvent fuq il-punti tat-tmiem imkejla (7), huwa rakkomandat li l-konċentrazzjoni tas-solvent tinżamm kemm jista' jkun baxxa possibbli.

17. Għal test semistatiku, jistgħu jiġu segwiti żewġ proċeduri ta' tiġdid differenti. Kwalunkwe waħda mis-soluzzjonijiet godda tat-test jithejjew f'kompartimenti nodfa u l-bajd u l-larvi li jibqgħu haġġin jiġu ttrasferiti bil-galbu f'kompartimenti godda, jew l-organizmi tat-test jinżammu fil-kompartimenti tat-test, filwaqt li jinbidel proporzjon (mill-inqas żewġ terzi) tas-soluzzjoni tat-test / tal-volum tal-kontroll.

PROCEDURA**Kundizzjonijiet tal-Esponiment***Durata*

18. It-test għandu jibda mill-aktar fis possibbli wara li l-bajd ikun iffertilizza u preferibbilment wara li jkun ġie mgħaddas fis-soluzzjonijiet tat-test qabel jibda t-tifriq tal-blastodisc, jew kemm jista' jkun qrib wara dan l-istadju. Id-durata tat-test ser tiddependi fuq l-ispeċijiet użati. Xi durati rakkomandati huma mogħtija fl-Appendiċi 2.

Tagħbija

19. In-numru ta' bajd fertilizzat fil-bidu tat-test għandu jkun biżżejjed sabiex jiġu ssodisfati r-rewkiziti tal-istatistika. Huma għandhom jiġu distribwiti b'mod aleatorju fost it-trattamenti u għandhom jintużaw mill-inqas 80 bajda, li jinqas b'mod uguali bejn mill-inqas erba' kompartimenti tat-test irreprikati. Ir-rata tat-tagħbija (il-bijomassa skont il-volum tas-soluzzjoni tat-test) għandha tkun baxxa biżżejjed sabiex tkun tista' tinżamm konċentrazzjoni mahlula ta' ossiġenu ta' mill-inqas 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja mingħajr ossiġenazzjoni matul l-istadju tal-bajda u tal-larva. Għat-testijiet bi fluss kontinwu, ġiet rakkomandata rata ta' tagħbija b'piz imxarrab ta' mhux aktar minn 0.5 g/l kull 24 siegħa u mhux inqas minn 5 g/l ta' soluzzjoni fi kwalunkwe hin (3).

Id-dawl u t-temperatura

20. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu adattati għall-ispeċi tat-test (ara Appendiċi 2).

Tmigh

21. L-ikel u t-tmigh huma kritiċi u huwa essenzjali li jiġi fornut l-ikel korrett għal kull stadju tal-ħajja minn żmien xieraq u f'livell suffiċjenti sabiex jiġi sostnut it-tkabbir normali. It-tmigh għandu jkun bejn wieħed u ieħor ugwali fost ir-repliki, sakemm ma jiġix aġġustat biex jiehu kont tal-mortalità. Għandhom jitneħħew l-ikel u r-rawt żejda, skont kif ikun hemm bżonn, sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni ta' skart. Ir-regimi tat-tmigh dettaljati huma mogħtija fl-Appendiċi 3 iżda, bl-esperjenza li qiegħda tinkiseb, ir-regimi tal-ikel u tat-tmigh qegħdin jiġu raffinati kontinwament sabiex tittejjeb is-sopravivenza u jiġi ottimizzat it-tkabbir. L-ikel ħaj jipprovdi sors ta' arrikkiment ambjentali u, għalhekk, għandu jintuza minflok jew flimkien mal-ikel imnixxef jew iffriżat, kull meta jkun xieraq għall-ispeċijiet u għall-istadju tal-ħajja.

Il-konċentrazzjonijiet tat-test

22. Normalment ikunu meħtieġa hames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, b'minimu ta' erba' repliki kull konċentrazzjoni, spazjati b'fattur kostanti ta' mhux aktar minn 3.2. Jekk tkun disponibbli, għandha tiġi kkunsidrata l-informazzjoni dwar l-ittestjar akut, preferibbilment bl-istess speċi u/jew test tas-sejbien tal-medda (1) meta tintgħażel il-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test. Madankollu, għandhom jiġu kkunsidrati s-sorsi ta' informazzjoni kollha meta tintgħażel il-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, inklużi

▼ **M7**

sorsi bhal, pereżempju, “read-across” dejta dwar l-ittestjar tat-tossicità akuta tal-embrijuni tal-hut. Test tal-limitu, jew test tal-limitu estiż, b'inqas minn hames konċentrazzjonijiet bhala t-test definittiv, jista' jkun aċċettabbli meta jkunu jridu jiġu stabbiliti biss l-NOECs empiriċi. Għandha tinghata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn hames konċentrazzjonijiet. Konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test ta' aktar minn 96 siegħa LC₅₀ jew 10 mg/l, skont liema tkun l-aktar baxxa, ma hemmx bżonn li jiġu ttestjati.

Kontrolli

23. Għandu jsir kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u, jekk ikun mehtieg, kontroll tas-solvent li jkun fih it-trasportatur tas-solvent biss, minbarra s-serje tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 16).

Il-Frekwenza tal-Kejl u d-Determinazzjonijiet Analitiċi

24. Qabel il-bidu tal-perjodu ta' esponiment, għandha tiġi żgurata l-funzjoni xierqa tas-sistema tal-kunsinna tas-sustanza kimika fost ir-repliki kollha (pereżempju, billi jitkejl l-konċentrazzjonijiet tat-test). Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi mehtieġa, inkluż limitu xieraq ta' kwantifikazzjoni (LOQ) u għarfien suffiċjenti dwar l-istabilità tas-sustanza fis-sistema tal-ittestjar. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu ddeterminati f'intervalli regolari sabiex jiġi kkaratterizzat l-esponiment. Huwa mehtieg minimu ta' hames determinazzjonijiet. Fis-sistemi bi fluss kontinwu, il-kejl analitiku tas-sustanza kimika tat-test f'replikati wiehed għal kull konċentrazzjoni għandu jsir mill-inqas darba fil-gimgha u jinbidel sistematikament fost ir-repliki. Id-determinazzjonijiet analitiċi addizzjonali ta' spiss ijebru l-kwalità tal-eżitu tat-test. Jista' jkun mehtieg li l-kampjuni jiġu ffiltrati sabiex titneħħa kwalunkwe materja partikulata (eż. bl-użu ta' daqs ta' 0.45 µm tal-pori) jew inkella jiġu ċċentrifugati sabiex jiġi żgurat li d-determinazzjonijiet fuq is-sustanza kimika jsiru f'soluzzjoni vera. Sabiex jitnaqqas l-adsorbiment tas-sustanza kimika tat-test, il-filtri għandhom jiġu ssaturati qabel jintużaw. Meta l-konċentrazzjonijiet imkejla ma jibqgħux fil-medda ta' 80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom jiġu ddeterminati u espressi b'mod relattiv għall-konċentrazzjoni medja aritmetika għat-testijiet bi fluss kontinwu (ara l-Appendiċi 6 tal-metodu tal-ittestjar C.20 għall-kalkolazzjoni tal-medja aritmetika (8)) u jiġu espressi b'mod relattiv għall-medja ġeometrika tal-konċentrazzjonijiet imkejla għat-testijiet semistatiċi (ara l-Kapitolu 5 fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossicità akwatika ta' sustanzi u tahlitiet diffiċli (2)).
25. Matul it-test, l-ossiġenu dissolt, il-pH u t-temperatura għandhom jitkejl fir-riċipjenti kollha tat-test, mill-inqas kull ġimgha, filwaqt li s-salinità u l-ebusija, jekk ikunu ġustifikati, għandhom jitkejl fil-bidu u fi tmiem it-test. Idealment, it-temperatura għandha tiġi ssorveljata kontinwament f'mill-inqas riċipjent wiehed tat-test.

Osservazzjonijiet

26. **Stadju tal-iżvilupp embrijoniku:** l-istadju embrijoniku fil-bidu tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test għandu jiġi vverifikat bl-aktar mod preċiż possibbli. Dan jista' jsir bl-użu ta' kampjun rappreżentattiv ta' bajd ippreservat u mnaddaf kif xieraq.
27. **Tifqis u sopravivenza:** l-osservazzjonijiet fuq it-tifqis u s-sopravivenza għandhom isiru mill-inqas darba kuljum u n-numri jridu jiġu rreġistrati. Jekk jiġi osservat fungu fuq il-bajd fi stadju bikri tal-iżvilupp tal-embrijun (eż. fl-ewwel jum fit-tieni jum tat-test), dak il-bajd għandu jingħadd u jitneħħa. Embrijuni, larva u hut żgħir mehtin għandhom jitneħħew malli jiġu osservati minhabba li jistgħu jitmermru malajr u jistgħu jifarrku minhabba l-ażzjonijiet tal-hut l-iehor. Għandha tinghata attenzjoni estrema meta jitneħħew individwi mehtin sabiex ma ssirx hsara fiżika lill-bajd/larva li jmissu magħhom. Is-sinjali ta' mewt ivarjaw skont l-ispeċi u l-istadju tal-hajja. Pereżempju:

▼ M7

- għall-bajd fertilizzat: partikolarment fl-istadji bikrija, nuqqas notevoli ta' traslucidi u bidla fil-kulur, kawża ta' koagulazzjoni u/jew preċipitazzjoni ta' proteini, li twassal għal dehra bajda opaka;
 - għall-embrijuni, għal-larva u għall-hut żgħir: immobilità u/jew nuqqas ta' moviment respiratorju u/jew nuqqas ta' tahbit tal-qalb u/jew nuqqas ta' reazzjoni għal stimulu mekkaniku.
28. **Dehra anormali:** in-numru ta' larva jew hut żgħir li juru anormalità fil-forma tal-ġisem għandu jiġi rreġistrat f'intervalli adegwati skont id-durata tat-test u n-natura tal-anormalità deskritta. Ta' min jinnota larva u hut żgħir anormali jsejnhu b'mod naturali u jistgħu jkunu fl-ordni ta' perċentwal kbir fil-kontroll(i) fxi speċijiet. Meta d-deformitajiet u l-imġiba anormali assoċjata jitqiesu li huma tant severi li jkun hemm tbatija konsiderevoli għall-organiżmu u dan ikun lahaq punt fejn ma jkunx jista' jirkupra, huwa jista' jitneħħa mit-test. Dawn l-annimali għandhom jiġu ewtanizzati u ttrattati bħala mortalitajiet għal analiżi tad-dejta sussegwenti. L-iżvilupp normali tal-embrijuni kien iddokumentat għall-maġġoranza tal-ispeċijiet irrakkomandati f'dan il-metodu ta' ttestjar (9) (10) (11) (12).
29. **Imġiba anormali:** l-anormalitajiet, pereżempju, iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, trankwillità atipika u mġiba atipika tat-tmigh għandhom jiġu rreġistrati f'intervalli adegwati skont id-durata tat-test (pereżempju darba kuljum għal speċijiet li jgħixu filma shun). Dawn l-effetti, għalkemm diffiċli jiġu kkwantifikati, jistgħu, meta jiġu osservati, jgħinu fl-interpretazzjoni tad-dejta dwar il-mortalità.
30. **Piż:** fi tmiem it-test, il-hut kollu li jibqa' ħaj jintizen mill-inqas fuq bażi replikata (permezz tar-rappurtar tal-ghadd ta' annimali fir-replikati u tal-piż medju għal kull annimal): il-piż imxarrab — (imnixxef bit-taptop) huwa ppreferut, madankollu, tista' tiġi rapportata wkoll dejta dwar il-piż xott (13).
31. **Tul:** fi tmiem it-test, jitkejlu t-tulijiet individwali. It-tul totali huwa rrakkomandat, madankollu, jekk il-ġewnaħ tad-denb jithassar jew jithaffer, jista' jintuza it-tul standard. L-istess metodu għandu jintuza għall-hut kollu f'test partikolari. It-tul individwali jista' jitkejjel permezz ta', pereżempju, kalipers, kamera digitali jew mikrometru okulari kkalibrat. It-tulijiet minimi tipiċi huma definiti fl-Appendiċi 2.

DEJTA U RAPPORTAR

Trattament tar-riżultati

32. Huwa rrakkomandat li d-disinn tal-esperiment u l-ghazla tat-test statistiku jippermettu qawwa adegwata (80 % jew ogħla) sabiex jiġu identifikati l-bidliet ta' importanza bijoloġika fil-punti tat-tmiem fejn għandha tiġi rapportata NOEC. Ir-rappurtar tal-koncentrazzjonijiet tal-effett u l-parametri rilevanti jista' jiddependi fuq il-qafas regolatorju. Jekk irid jiġi rapportat EC_x , id-disinn tal-esperiment u l-ghazla tal-mudell ta' rigressjoni għandhom jippermettu li ssir stima tal- EC_x sabiex b'hekk (i) l-intervall ta' fiduċja ta' 95 % irrapportat għal EC_x ma jkunx fih zero u ma jkunx wiesa' żżejjed, (ii) l-intervall ta' fiduċja ta' 95 % għall-medja mbassra f' EC_x ma jkunx fih il-medja tal-kontroll u (iii) ma jkun hemm ebda nuqqas ta' adattament sinifikanti tal-mudell ta' rigressjoni għad-dejta. Kwalunkwe wiehed mill-approċċi jirrikjedi l-identifikazzjoni tal-bidla perċentwali f'kull punt ta' tmiem li huwa importanti li jiġi identifikat jew stmat. Id-disinn sperimentali għandha jiffassal biex jippermetti dan. Meta l-kundizzjonijiet għad-determinazzjoni tal- EC_x ma

▼ M7

jigux issodisfati, għandu jintuża l-approċċ ta' NOEC. Mhuwiex probabbli li l-istess bidla perċentwali tapplika għall-punti tat-tmiem kollha, lanqas ma huwa probabbli li jkun jista' jiġi ddisinjat esperiment fattibbli li jissodisfa dawn il-kriterji għall-punti tat-tmiem kollha, għalhekk huwa importanti li wiehed jiffoka fuq il-punti tat-tmiem, li huma importanti għall-esperiment rispettiv sabiex l-esperiment jiġi ddisinjat kif xieraq. Il-flow diagrams ta' statistika u l-gwida għal kull approċċ huma disponibbli fl-Appendiċijiet 5 u 6 sabiex iservu ta' gwida fit-trattament tad-dejta u fl-għażla tal-aktar test ta' statistika jew mudell xieraq li għandu jintuża. Jistgħu jintużaw approċċi ta' statistika oħrajn, diment li jkunu xjentifikament ġustifikati.

33. Ser ikun neċessarju li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki bl-użu ta' analiżi tal-varjanza jew proċeduri b'tabella ta' kontinġenza u li jintużaw il-metodi ta' analiżi statistika xierqa abbażi ta' din l-analiżi. Sabiex ikunu jistgħu jsiru paraguni multipli bejn ir-riżultati fil-koncentrazzjonijiet individwali u dawk għall-kontrolli, huwa rrakkomandat li jsir it-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra jew ta' Williams għal risponsi kontinwi u test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage għal risponsi kwantali li huma konsistenti ma' rispons ta' konċentrazzjoni monotona u mingħajr ebda evidenza ta' varjanza extra-binomjali (14). Meta jkun hemm evidenza ta' varjanza extra-binomjali, hija rrakkomandata modifika ta' Rao-Scott tat-test ta' Cochran-Armitage (15) (16) jew jiġi applikat it-test ta' Williams jew Dunnett (wara trasformazzjoni arcsin-square-root) jew ta' Jonckheere-Terpstra għall-proporzjonijiet irreprikati. Meta d-dejta ma tkunx konsistenti ma' rispons ta' konċentrazzjoni monotona, il-metodu ta' Dunnett jew Dunn jew dak ta' Mann-Whitney jista' jinstab li huwa utli għal risponsi kontinwi, filwaqt li t-test Eżatt ta' Fisher jista' jinstab li huwa utli għal risponsi kwantali (14) (17) (18). Għandha tingħata attenzjoni meta jiġi applikat kwalunkwe metodu jew mudell ta' statistika sabiex ikun żgurat li r-rekwiziti tal-metodu jew tal-mudell jiġu ssodisfati (eż. il-varjabbiltà minn kompartment minn ieħor hija stmata u kkunsidrata fid-disinn sperimentali u fit-test jew fil-mudell użat). Id-dejta għandha tiġi evalwata għan-normalità u l-Appendiċi 5 jindika x'għandu jsir fuq ir-residwi minn ANOVA. L-Appendiċi 6 jiddiskuti kunsiderazzjonijiet addizzjonali għall-approċċ ta' rigressjoni. Għandhom jiġu kkunsidrati t-trasformazzjonijiet sabiex jiġu ssodisfati r-rekwiziti ta' test tal-istatistika. Madankollu, it-trasformazzjonijiet li jippermettu t-tqabbil ta' mudell ta' rigressjoni jehtieġu attenzjoni kbira, minhabba li, pereżempju, bidla ta' 25 % fir-reazzjoni mhux ittrasformata ma tikkorrespondix għal bidla ta' 25 % frispons ittrasformat. Fl-analiżijiet kollha, il-kompartment tat-test, mhux il-ħut individwali, huwa l-unità tal-analiżi u l-unità sperimentali u kemm it-testijiet tal-ipoteżi kif ukoll ir-rigressjoni għandhom jirriflettu dan (3) (14) (19) (20).

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test:

Sustanza monokostitwenti

- id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma u proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika, bħall-IUPAC jew l-isem CAS, in-numru CAS, SMILES jew il-kodiċi InChI, il-formula strutturali, il-purità, l-identità tas-sustanza kimika tal-impurità, kif xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (Inkluz il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk ikun xieraq.

Sustanza multi-kostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

- ikkaratterizzati kemm jista' jkun possibbli, eż., mill-identità tas-sustanza kimika (ara fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti

Speċijiet tat-test:

- l-isem xjentifiku, ir-razza, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd iffertilizzat u t-trattament sussegwenti.

▼ **M7***Kundizzjonijiet tat-test:*

- il-proċedura tat-test użata (pereżempju, semistatika jew bi fluss kontinwu, tagħbija);
- fotoperjodu/i;
- id-disinn tat-test (pereżempju, l-ghadd ta' kompartimenti tat-test u repliki, l-ghadd ta' bajd għal kull replika, il-materjal u d-daqs tal-kompartiment tat-test (l-gholi, il-wisa', il-volum), il-volum tal-ilma għall-kompartiment tat-test);
- il-metodu ta' thejjiġa tas-soluzzjonijiet ewlenin u l-frekwenza tat-tigdid (għandhom jingħataw l-aġent solubilizzanti u l-konċentrazzjoni tiegħu, meta jintużaw);
- il-metodu li jintuża għad-dożaġġ tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompi, sistemi ta' dilwizzjoni)
- l-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-konċentrazzjonijiet tat-test nominali, il-limitu tal-kwantifikazzjoni, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom fir-reċipjenti tat-test u l-metodu li permezz tiegħu nkisbu u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test f'soluzzjoni vera;
- il-karatteristiċi tal-ilma tad-dilwizzjoni: pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-klorin residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), is-solidi sospizi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;
- il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;
- informazzjoni dettaljati dwar it-tmiġh (pereżempju, it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Riżultati rrapportati individwalment (jew fuq bażi rreplikata) u bħala medja u koeffiċjent tal-varjazzjoni, kif xieraq, għall-punti tat-tmiem li ġejjin:

- evidenza li l-kontrolli ssodisfaw l-istandard ta' aċċettabbiltà tas-sopravivenza globali tal-ispeċi għat-test (Appendiċi 2);
- dejta dwar il-mortalità f'kull stadju (embrijun, larva u żgħir) u l-mortalità kumulattiva;
- jiem għat-tifqis, numru ta' larva li faqqsu kull jum u t-tmiem tat-tifqis;
- in-numru ta' ħut f'saħħtu f' tmiem it-test;
- dejta għat-tul (speċifika l-istandard jew l-ammont totali) u l-piż tal-annimali li jibqgħu hajjin;
- l-inċidenza, id-deskrizzjoni u n-numru ta' anormalitajiet morfoloġiċi, jekk hemm;
- l-inċidenza, id-deskrizzjoni u n-numru ta' effetti ta' mġiba, jekk hemm;
- l-approċċ għall-analiżi statistika (analizi ta' rigressjoni jew analizi tal-varjanza) u t-trattament tad-dejta (it-test statistiku jew il-mudell użat);
- il-konċentrazzjoni bla effett osservat għal kull rispons ivvalutat (NOEC);

▼M7

- il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat ($p = 1,05$) għal kull rispons ivvalutat (LOEC);
- EC_x għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 90 % jew 95 %) u graff tal-mudell imqabbel għall-kalkolazzjoni tagħha, l-inklinazzjoni tal-kurva tar-rispons ta' konċentrazzjoni, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-izbalji standard tagħhom.

Kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu tal-ittestjar.

Diskussjoni tar-riżultati, inkluża kwalunkwe influwenza tad-devjazzjonijiet mill-metodu ta' ttestjar fuq l-eżitu tat-test.

Tabella 1

Speċi ta' hut rakkomandat għat-test

ILMA HELU	ILMA SALMURA U BAHAR
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trotta qawsalla	<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpjun tas-sniien varjegati
<i>Pimephales promelas</i> Karpjun buras	<i>Menidia</i> sp. Menidja
<i>Danio rerio</i> Żebra	
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	

TAGHRIF

- (1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.
- (3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.
- (4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.
- (8) Il-Kapitolu 20 ta' dan l-Anness, *Daphnia magna* Reproduction Test.
- (9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B.*et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

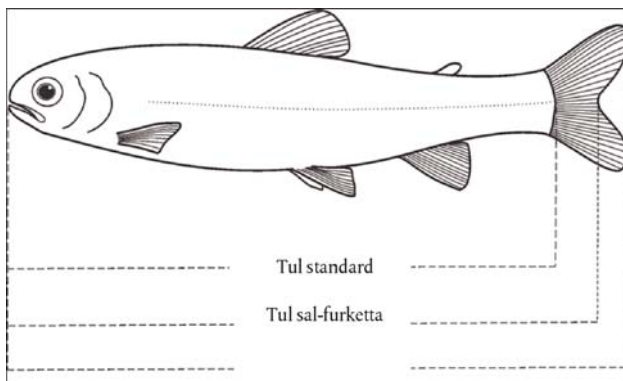
▼ **M7**

- (11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.
- (12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..
- (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 — 376.
- (14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.
- (16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.
- (17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
- (19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

DEFINIZZIONI E T

Tul totali (total length - TL): jirreferi ghat-tul mill-ponta tal-geddum sal-ponta tal-lobu itwal tad-denb, ġeneralment imkejjel bil-lobi kkompessati tul il-linja tan-nofs. Dan huwa kejl ta' linja dritta, li ma jitkejjilx fuq il-kurva tal-gisem (www.fishbase.org)

Deskrizzjoni tat-tulijiet differenti użati



SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

IL-KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST, ID-DURATA U L-KRITERJI TAS-SOPRAVIVENZA GHALL-ISPEĊIJET IRRAKKOMANDATI

SPEĊIJJET	IL-KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST			IRRAKKOMANDATI DURATA TAT-TEST	It-tul totali medju minimu tipiku tal-hut tal-kontroll fi tmiem l-istudju (mm) ⁽¹⁾	IS-SOPRAVIVENZA TAL-KONTROLLI (minima)	
	It-temperatura (°C)	Salinità (‰)	Fotoperjodu (sigħat)			Is-suċċess tat-tifqis	Is-suċċess wara t-tifqis
Ilma Helu:							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trotta qawsalla	10 ± 1,5 ⁽²⁾		12 - 16 ⁽³⁾	ġimagħtejn wara li l-kontrolli jibdwew jieklu wehldhom (jew 60 jum wara t-tifqis)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i> Karpjun buras	25 ± 1,5		16	32 jum mill-bidu tat-test (jew 28 jum wara t-tifqis)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Zebra	26 ± 1,5		12 - 16 ⁽⁴⁾	30 jum wara t-tifqis	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	25 ± 2		12 - 16 ⁽⁴⁾	30 jum wara t-tifqis	17	80 %	80 %
Tal-Estwarju u tal-Baħar:							
<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpjun tas-sniien varjegati	25 ± 1,5	15-35 ⁽⁵⁾	12 - 16 ⁽⁴⁾	32 jum mill-bidu tat-test (jew 28 jum wara t-tifqis)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Menidja	22 - 25	15-35 ⁽⁵⁾	13	28 jum	20	80 %	60 %

Spjega:

- ⁽¹⁾ It-tul totali medju minimu tipiku mhuwiex kriterju ta' validità, iżda d-devjazzjonijiet taħt iċ-ċifra indikata għandhom jiġu eżaminati bir-reqqa b'rabta mas-sensittività tat-test. It-tul totali medju minimu huwa mnissel minn għażla ta' dejta disponibbli fil-hin attwali.
- ⁽²⁾ Ir-razza partikolari tat-trotta qawsalla ttestjata tista' tirrikjedi l-użu ta' temperaturi oħrajn. L-istokk riproduttiv għandu jinżamm fl-istess temperatura bħal dik li tintuża għall-bajd. Wara li jasal il-bajd minghand nissiel kummerċjali, jeħtieġ li jsir adattament qasir (pereżempju ta' siegħa jew sagħtejn) sabiex tiġi ttestjata t-temperatura wara l-wasla.
- ⁽³⁾ Dlam għal-larva sa ġimgħa wara t-tifqis, hlief meta tkun qed tiġi spezzjonata, imbagħad dawl baxx matul it-test (fotoperjodu ta' bejn 12 u 16-il siegħa) ⁽⁴⁾.
- ⁽⁴⁾ Għal kwalunkwe kundizzjonijiet tat-test partikolari, ir-reġim tad-dawl għandu jkun kostanti.
- ⁽⁵⁾ Għal kwalunkwe test partikolari, dan għandu jsir għal ± 2‰.

GWIDA DWAR IT-TMIGH U T-TRATTAMENT GHAR-RIPRODUZZJONI U L-ITTESTJAR TA' ANNIMALI TAL-ISPEĊIJET IRRAKKOMANDATI

SPEĊIJJET	IKEL (*)				IL-HIN TAT-TRASFERI- MENT WARA T-TIFQIS	IL-HIN SAL-EWWEL TMIGH
	Hut riproduttiv	Larva li ghadha tfaqqas	Zgħar			
			Tip	Frekwenza		
Ilma Helu:						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trotta qawsalla	ikel tat-trota	Xejn ^(a)	ikel tal-bidu tat-trota BSN	2-4 porzjonijiet ta' għalf kuljum	14-16-il jum wara t- tifqis jew fl-ghawma (mhux essenzzjali)	19-il jum wara t-tifqis jew fl- ghawma
<i>Pimephales promelas</i> Karpjun buras	BSN, ikel imsaffaf, FBS	BSN	BSN48, ikel imsaffaf	2-3 darbiet kuljum	ladarba t-tifqis ikun 90 %	jumejn wara t-tifqis
<i>Danio rerio</i> Żebra	BSN, ikel imsaffaf,	Ikel tal-larva kummerċjali, protozoa ^(b) , proteina ^(c)	BSN48, ikel imsaffaf	BSN darba kuljum; Ikel imsaffaf darbtejn kuljum	ladarba t-tifqis ikun 90 %	jumejn wara t-tifqis
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	ikel imsaffaf	BSN, ikel imsaffaf (jew protozoa jew rotiferi)	BSN48, ikel imsaffaf (jew rotiferi)	BSN darba kuljum; ikel imsaffaf darbtejn kuljum jew ikel imsaffaf u rotiferi darba kuljum	mhux applikabbli	6-7 ijiem wara l-bidien
Tal-Estwarju u tal-Bahar:						
<i>Cyprinodon variegatus</i> Karpjun tas-sniien varjegati	BSN, ikel imsaffaf, FBS	BSN	BSN48	2-3 porzjonijiet ta' għalf kuljum	mhux applikabbli	jum wara t-tifqis/l-ghawma
Menidia sp. Menidja	BSN48, ikel imsaffaf	BSN	BSN48	2-3 porzjonijiet ta' għalf kuljum	mhux applikabbli	jum wara t-tifqis/l-ghawma

Spjega:

(*) L-ikel għandu jingħata sakemm il-hut jixba'. Għandhom jitnehhew ikel u rawt żejda, skont kif ikun hemm bżonn, sabiex tiġi evitata akkumulazzjoni ta' skart

FBS gambli tal-ilma mielaħ iffriżati; adulti *Artemia* sp

BSN gambli nauplii tal-ilma mielaħ; għandhom kif faqqsu

BSN48 gambli nauplii tal-ilma mielaħ; f'età ta' 48 siegħa

^(a) il-larva mill-membrana tal-isfar tal-bajd ma għandhiex bżonn ikel

^(b) iffiltrati minn kultura mħallta

^(c) bcejjeċ żgħar minn proċess ta' fermentazzjoni

▼ **M7***Appendiċi 4***XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI
AĊĊETTABBLI**

Komponent	Konċentrazzjoni limitu
Materja partikolata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonja mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromju	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Hadid	1 µg/l
Ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

▼ M7

Appendiċi 5

GWIDA STATISTIKA GHAD-DETERMINAZZJONI TAL-NOEC

Ġenerali

It-tank irreplikant huwa l-unità tal-analizi. B'hekk, għall-kejl kontinwu, bħad-daqs, għandhom jiġu kkalkolati l-medji tal-irreplikanti jew il-medjani tal-irreplikanti u dawn il-valuri tal-irreplikanti huma d-dejta għall-analizi. Għandha tintwera l-qawwa tat-testijiet użati, preferibbilment abbażi ta' database storika adegwata għal kull laboratorju. L-effett tad-daqs li jista' jiġi identifikat b'qawwa ta' 75-80 % għandu jiġi pprovdut għal kull punt tat-tmiem bit-test statistiku li jrid jintuża.

Id-databases disponibbli fiż-żmien tal-iżvilupp ta' dan il-metodu ta' ttestjar jistabbilixxu l-qawwa possibbli skont il-proċeduri statistiċi rrakkomandati. Laboratorju individwali għandu juri l-abbiltà tiegħu li jissodisfa dan ir-rekwiżit tal-qawwa billi jwettaq l-analizi tal-qawwa tiegħu stess jew billi juri li l-Koeffiċjent tal-Varjazzjoni (CV) għal kull rispons ma jaqbiż id-90 percentil tas-CVs użati fl-iżvilupp tat-TG. It-Tabella 1 tipprovi dawn is-CVs. Jekk ikunu disponibbli biss il-medji tal-irreplikanti jew il-medjani tal-irreplikanti, mela allura s-CV irreplikant jista' jiġi injorat.

Tabella 1

Id-90 Perċentil tas-CVs għall-Ispedijiet tal-Ilma Helu magħżula

Speċijiet	Rispons	CV Bejn ir-Repliki	CV Fi hdan ir-Repliki
Trota Qawsalla	Tul	17,4	9,8
	Piż	10,1	28
Karpjun Buras	Tul	16,9	13,5
	Piż	11,7	38,7
Żebra	Tul	43,7	11,7
	Piż	11,9	32,8

Kważi għat-testijiet statistiċi kollha użati għall-evalwazzjoni tal-istudji tossikoloġiċi fil-laboratorji, il-paraguni ta' interess għandhom jiġu kkontrollati mill-gruppi ta' trattament. Għal dik ir-raġuni, mhuwiex xieraq li jintalab li jsir test F sinifikanti ta' ANOVA qabel l-użu tat-test ta' Dunnett jew ta' Williams jew test sinifikanti ta' Kruskal-Wallis qabel l-użu tat-test ta' Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney jew Dunn (Hochberg and Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

It-test ta' Dunnett għandu aġġustament ta' multipliċità inkorporat u r-rati pożittivi foloz u negattivi foloz tiegħu huma affettwati b'mod avvers bl-użu tat-test F bħala għassies. B'mod simili, it-testijiet b'tendenza rigressiva ta' Williams u Jonckheere-Terpstra li jużaw livell ta' sinifikat ta 0.05 f'kull pass jippreservaw rata pożittiva falza globali ta' 5 % u r-rata u l-qawwa tat-testijiet jiġu affettwati b'mod avvers bl-użu tat-test F- jew Kruskal-Wallis bħala kustodju. It-testijiet ta' Mann-Whitney u ta' Dunn għandhom jiġu aġġustati għall-multipliċità u huwa rrakkomandat l-aġġustament ta' Bonferroni-Holm.

Diskussjoni fil-fond rigward il-maġġoranza tar-rakkomandazzjonijiet dwar l-ittestjar tal-ipoteżi u l-verifika tas-suppożizzjonijiet sottostanti għal dawn it-testijiet hija mogħtija fl-OECD (2006), li tinkludi wkoll bibliografija estensiva.

▼ **M7****It-trattament tal-Kontrolli meta Jintuża Solvent**

Jekk jintuża solvent, għandhom jiġu inklużi kemm kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni kif ukoll kontroll tas-solvent. Iż-żewġ kontrolli għandhom jitqabblu għal kull rispons u jiġu kkombinati għal analiżi statistika jekk ma tinstab ebda differenza sinifikanti bejn il-kontrolli. Altrimenti, għandu jintuża l-kontroll tas-solventi għad-determinazzjoni tal-NOEC jew għall-istima tal-EC_x u ma jintużax il-kontroll tal-ilma. Ara r-restrizzjoni fil-kriterji tal-validità (Paragrafu 7).

Għat-tul, il-piż, il-proporzjon ta' tifqis tal-bajd jew mortalità tal-larva jew larva anormali, u għall-ewwel jew l-aħħar jum tat-tifqis jew tal-ghawma, għandu jintuża T-test jew it-test ta' Mann-Whitney sabiex il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni jitqabbel mal-kontroll tas-solvent fl-ivell ta' sinifikat ta' 0.05, billi jiġu injorati l-gruppi tat-trattamenti kollha. Ir-riżultati ta' dawn it-testijiet għandhom jiġu rrapportati.

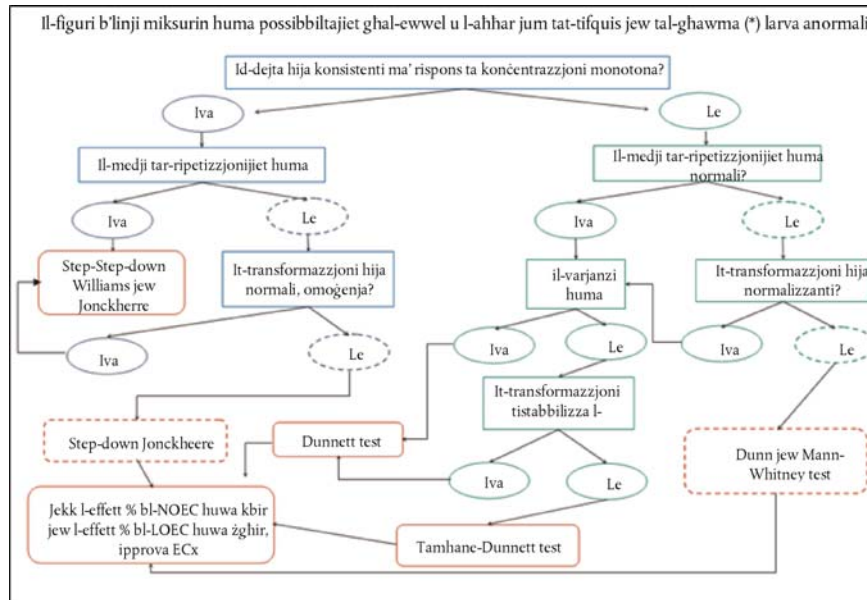
Il-kejl tad-daqs (it-tul u l-piż)

Il-valuri tat-tul u tal-piż tal-hut individwali jistgħu jiġu distribwiti b'mod normali jew log-normali. Fi kwalunkwe każ, il-valuri medji rreplikati għandhom it-tendenza li jkunu distribwiti b'mod normali permezz tas-Central Limit Theorem u kkonfermati mid-dejta minn aktar minn 100 studju tal-ELS ta' tliet speċijiet li jgħixu fl-ilma helu. Inkella, meta d-dejta jew id-databases storici jissuggerixxu distribuzzjoni b'log-normali għall-valuri ta' daqsijiet ta' hut individwali, jista' jiġi kkalkolat il-logaritmu medju rreplikati tal-valuri tal-hut individwali u d-dejta għall-analiżi tista' mbagħad tkun l-anti-logs ta' dawn il-logaritmi medji rreplikati.

Id-dejta għandha tiġi evalwata għall-konsistenza b'distribuzzjoni normali u omogeneità tal-varjanza. Għal dan il-ghan, għandhom jintużaw ir-residwi minn mudell ANOVA b'koncentrazzjoni bħall-varjabbli tal-klassi ta' spjegazzjoni waħda. Tista' tintuża determinazzjoni viżiva minn plotts ta' diffużjoni u istogrammi jew minn stem-and-leaf plots. B'mod alternattiv, jista' jintuża test formali bħal Shapiro-Wilk jew Anderson-Darling. Il-konsistenza mal-omogeneità tal-varjanza tista' tiġi vvalutata minn eżaminazzjoni viżiva tal-istess plott ta' diffużjoni jew b'mod formali permezz tat-test ta' Levene. Huma biss it-testijiet parametriċi (eż. ta' Williams, Dunnett) li jehtieġ li jiġu evalwati għan-normalità jew għall-omogeneità tal-varjanza.

Għandha tingħata attenzjoni lill-outliers possibbli u lill-effett tagħhom fuq l-analiżi. Jistgħu jintużaw it-test tal-outlier ta' Tukey u l-ispezzjoni viżiva tal-istess plottijiet ta' residwi deskritti hawn fuq. Għandu jiġi mfakkar li l-osservazzjonijiet huma repliki shah, għalhekk, it-thollija barra ta' outlier mill-analiżi għandha ssir biss wara kunsiderazzjoni bir-reqqa.

It-testijiet statistiċi li jagħmlu użu mill-karatteristiċi tad-disinn sperimentali u l-aspettattiva bijoloġika huma testijiet b'tendenza rigressiva, bħal Williams u Jonckheere-Terpstra. Dawn it-testijiet jassumu rispons ta' koncentrazzjoni monotona u d-dejta għandha tiġi vvalutata għall-konsistenza ma' dik is-suppożizzjoni. Dan jista' jsir b'mod viżiv minn plott ta' diffużjoni tal-medji rreplikati fl-isfond tal-koncentrazzjoni tat-test. Ikun utli jekk dak il-plott ta' diffużjoni jiġi sovrappost bi plott lineari segmentat li jgħaqqad il-medji tal-koncentrazzjoni ponderati skont id-daqs tal-kampjun irreplikati. Devjazzjoni kbira ta' dan il-plott lineari segmentat minn monotoniċità tindika l-htieġa possibbli li jintużaw testijiet mingħajr tendenza. B'mod alternattiv, jistgħu jintużaw testijiet formali. Test formali sempliċi huwa għall-komputazzjoni tal-kuntrasti lineari u kwadratiċi tal-medji tal-koncentrazzjoni. Jekk il-kuntrast kwadratiċi jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx sinifikanti, din hija indikazzjoni ta' problema possibbli bil-monotoniċità, li għandha tiġi evalwata aktar mill-plotts. Meta n-normalità jew l-omogeneità tal-varjanza tikkostitwixxi kwistjoni, dawn il-kuntrasti jistgħu jinbnew minn dejta trasformati skont l-ordni tal-klassifikazzjoni. Jistgħu jintużaw proċeduri alternattivi, bħat-test ta' Bartholomew, għall-monotoniċità, iżda dawn iżidu l-kompleksità.

▼ **M7****Figura 2***Flow-Chart bil-Kejl tad-Daqs tal-NOEC (it-tul u l-piż)*

(*) Dawn ir-risponsi qatt ma jissodisfaw is-suppożizzjonijiet għall-analiżi jew il-mudelli paramettriċi.

Sakemm id-dejta ma tkunx konsistenti mar-rekwiżiti għal dawn it-testijiet, l-NOEC tiġi ddeterminata minn applikazzjoni b'tendenza rigressiva tat-test ta' Williams jew ta' Jonckheere-Terpstra. OECD (2006) jipprovdli dettalji dwar dawn il-proċeduri. Għad-dejta li mhijiex konsistenti mar-rekwiżiti għal test b'tendenza rigressiva, jista' jintuża t-test ta' Dunnett jew ta' Tamhane-Dunn (T3), li t-tnejn li huma għandhom aġġustamenti inkorporati għall-multiplikità. Dawn it-testijiet jassumu n-normalità u, fil-każ ta' Dunnett, l-omoġeneità tal-varjanza. Meta dawk il-kundizzjonijiet ma jiġux issodisfati, jista' jintuża t-test mhux parametrik ta' Dunn. OECD (2006) jinkludi dettalji għal dawn it-testijiet kollha. Il-figura 2 tagħti harsa ġenerali lejn kif tista' ssib it-test tal-ghazla tiegħek.

It-Tifqis tal-Bajd u s-Sopravivenza tal-Larva

Id-dejta hija dwar il-proporzjonijiet ta' bajd li jfaqqas jew larva li tibqa' ħajja frepli individwali. Dawn il-proporzjonijiet għandhom jiġu vvalutati għall-varjanza extra-binomjali, li hija komuni iżda mhux universali għal dan il-kejl. Il-flowchart fil-figura 3 hija gwida għat-test tal-ghazla; ara t-test għal deskrizzjonijiet iddettaljati.

Normalment jintużaw żewġ testijiet. Dawn huma t-test ta' Tarone C(α) (Tarone, 1979) u l-chi-squared tests, kull wieħed applikat separatament għal kull konċentrazzjoni tat-test. Jekk tinstab varjanza extra-binomjali f'konċentrazzjoni waħda tat-test, mela allura għandhom jintużaw metodi li jakkomodaw.

Formula 1*It-test ta' Tarone C (α) (Tarone 1979)*

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

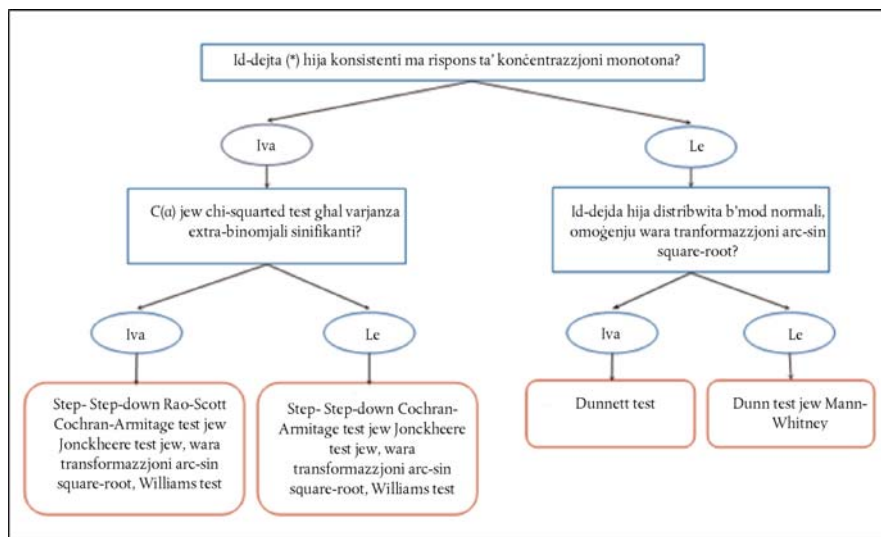
fejn $\hat{p}$ huwa l-proporzjon medju għal konċentrazzjoni partikolari, m huwa l-ghadd ta' tankijiet irreprikati, n_j huwa l-ghadd ta' suġġetti fir-replika j u x_j huwa l-ghadd

▼ **M7**

ta' suġġetti f'dik ir-replika li tirrispondi, eż. mhux imfaqqsin jew mejta. Dan it-test jiġi applikat għal kull konċentrazzjoni separatament. Dan it-test jista' jitqies bħala test agġustat tal-chi-square, iżda s-simulazzjonijiet b'qawwa limitata magħmula minn Tarone wrew li huwa aktar b'saħħtu minn test tal-chi-square.

Figura 3

Flow Chart tal-NOEC għat-Tifqis tal-Bajd u l-Mortalità tal-Larva



(*) Id-dejta hija proporzjon irreplikat.

Meta ma jkun hemm ebda evidenza sinifikanti ta' varjanza extra-binomjali, jista' jintuza t-test b'tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage. Dan it-test jinjora r-repliki, għalhekk, fejn ikun hemm tali evidenza, huwa rrakkomandat li jsir agġustament ta' Rao-Scott għat-test ta' Cochran-Armitage (RSCA), li jiehu f'kunsiderazzjoni r-repliki, id-daqsijiet tar-repliki u l-varjanza extra-binomjali. It-testijiet alternattivi jinkludu t-testijiet b'tendenza rigressiva ta' Williams u Jonckheere-Terpstra u t-test ta' Dunn test kif deskritti għall-kejl tad-daqs. Dawn it-testijiet japplikaw irrispettivament minn jekk ikunx hemm varjanza extra-binomjali, iżda għandhom qawwa kemmxejn aktar baxxa (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao and Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

L-Ewwel jew l-Aħhar Jum tat-Tifqis jew tal-Ghawma

Ir-rispons huwa integer, li jagħti l-jum tat-test li fih tigi osservata l-osservazzjoni indikata għal tank irreplikat partikolari. Il-medda tal-valuri ġeneralment tkun limitata hafna u sikwit ikun hemm proporzjonijiet kbar ta' valuri marbuta, pereżempju, jiġi osservat l-istess l-ewwel jum ta' tifqis fir-replikati ta' kontroll u forsi f'konċentrazzjoni wahda jew żewġ konċentrazzjonijiet baxxi tat-test. Testijiet parametriċi bħal Williams u Dunn test mhumiex addattati għal tali dejta. Sakemm ma jkunx hemm evidenza fuq non-monotoniċità serja, it-test b'tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra huwa b'saħħtu hafna għad-detezzjoni tal-effetti tas-sustanza kimika tat-test. Altrimenti, jista' jintuza t-test ta' Dunn.

Anormalitajiet tal-Larva

Ir-rispons huwa l-għadd ta' larva li b'xi mod tinstab li hija anormali. Dan ir-rispons ta' spiss ikun ta' inċidenza baxxa u jesperjenza whud mill-istess problemi bħall-ewwel jum tat-tifqis, kif ukoll xi drabi juri rispons erratiku għall-konċentrazzjoni. Jekk id-dejta mill-inqas bejn wiehied u iehor issegwi forma ta' konċentrazzjoni monotona, it-test b'tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra huwa b'saħħtu għall-identifikazzjoni tal-effetti. Altrimenti, jista' jintuza t-test ta' Dunn.

▼ **M7**

REFERENZI

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, 9-14.

▼ M7

Appendiċi 6

GWIDA STATISTIKA GHALL-ESTIMI TA' RIGRESSJONI

Ġenerali

L-osservazzjonijiet użati biex jiddahhal mudell huma medji rreplikati (tul u piż) jew proporzjonijiet irreplikati (tifqis tal-bajd u mortalità tal-larva) (OECD 2006).

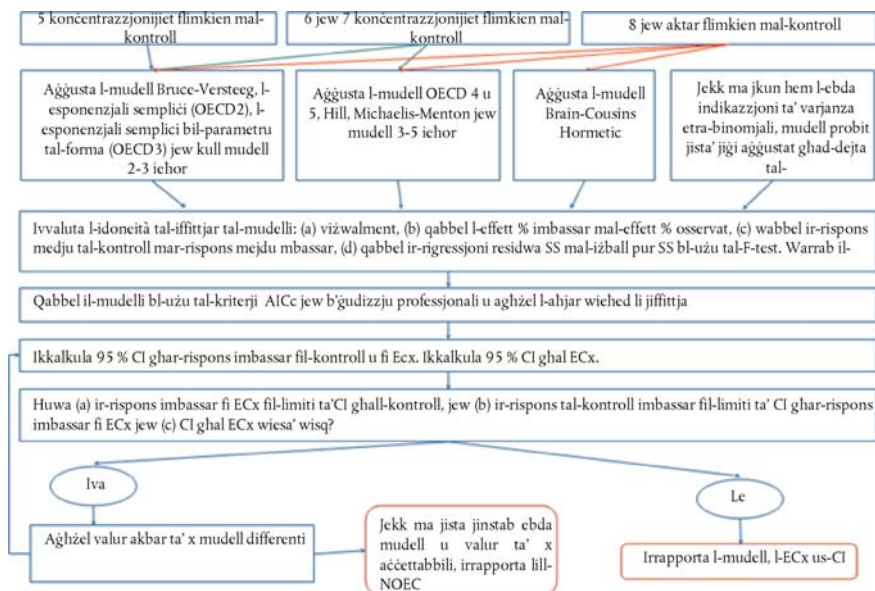
Ġeneralment, hija rrakkomandata rigressjoni ponderata li tuża d-daqs tal-kampjun irreplikati bħala l-piż. Huma possibbli skemi ta' ponderazzjoni oħrajn, bħall-ponderazzjoni b'rispons medju mbassar jew kombinazzjoni ta' dan u d-daqs tal-kampjun irreplikati. Mhix irrakkomandata l-ponderazzjoni b'varjanza reċiproka fi hdan il-kampjun ta' konċentrazzjoni (Bunke *et al.* 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky and Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Kwalunkwe trasformazzjoni tar-risponsi qabel analiżi għandha tippreserva l-indipendenza tal-osservazzjonijiet u l-EC_x u l-limiti ta' kunfidenza tagħha għandhom jiġu espressi fl-unitajiet oriġinali tal-kejl, aktar milli fl-unitajiet ittrasformati. Pereżempju, bidla ta' 20 % fil-logaritmu tat-tul mhijiex ekwivalenti għal bidla ta' 20 % fit-tul (Lyles *et al.* 2008, Draper and Smith 1999).

Il-flowchart fil-figura 4 tagħti harsa ġenerali lejn l-estimi tal-EC_x. Id-dettalji huma deskritti fit-test ta' hawn taht.

Figura 4

Flow chart għal EC_x Stima tat-Tul, tal-Piż jew tal-Proporzjon Medju Replikati tat-Tifqis tal-Bajd jew tal-Mortalità tal-Larva, ara t-test għal aktar dettalji



Kunsiderazzjonijiet għat-Tifqis tal-Bajd u għall-Mortalità tal-Larva

Għat-tifqis tal-bajd u l-mortalità tal-larva, huwa ġeneralment aħjar li jiddahhal mudell ta' tnaqqis, sakemm ma jiddahhalx mudell probit kif deskritt hawn taht. Jiġifieri, wiehed għandu jimmudella l-proporzjon ta' bajd li ma jfaqqasx jew ta' larvi li jmutu. Ir-raġuni għal dan hija li EC_x tirreferi għal konċentrazzjoni li fiha jkun hemm bidla uguali għal x % tar-rispons medju tal-kontroll. Jekk ikun hemm 5 % tal-bajd fil-kontroll li ma jfaqqasx u wiehed jimmudella n-nuqqas ta' tifqis, mela allura l-EC₂₀ tirreferi għal konċentrazzjoni li fiha jkun hemm bidla

▼M7

ugwali għal 20 % tal-5 % tal-bajd fil-kontroll li ma jfaqqisux, jiġifieri bidla ta' $0,2 \times 0,05 = 0,01$ jew punt perċentwal wiehed għal 6 % tal-bajd li ma jfaqqisux. Din il-bidla zghira ma tistax tiġi stmata bi kwalunkwe mod sinifikanti mid-dejta disponibbli u mhijiex bijoloġikament importanti. Filwaqt li, jekk wiehed jimmudella l-proporzjon tal-bajd li jfaqqsu, il-proporzjon tal-kontroll ikun 95 % f'dan l-eżempju u tnaqqis ta' 20 % mill-medja tal-kontroll ikun ifisser bidla ta' $0,95 \times 0,2 = 0,18$, għalhekk, minn rata ta' suċċess tat-tifqis ta' 95 % għal suċċess ta' tifqis ta' 77 % (= 95-18) u l-konċentrazzjoni tal-effetti tista' tiġi stmata u preżumibbilment hija ta' interess akbar. Din ma tikkostitwixxi ebda kwistjoni bil-kejl tad-daqs, għalkemm l-effetti avversi fuq id-daqs ġeneralment ifissru tnaqqis fid-daqs.

Mudelli għad-Daqs (tul jew piż) u s-Suċċess tat-Tifqis tal-Bajd jew is-Sopravivenza tal-Larva.

Għajr għall-mudell ormetiku ta' Brain-Cousens, dawn il-mudelli kollha huma deskritti u rrakkomandati fl-OECD (2006). Dawn il-mudelli, imsejha OECD 2-5, huma diskussi wkoll għall-esperimenti tal-ekotossicità fi Slob (2002). Ovvjament, hemm hafna mudelli oħrajn li jistgħu jkun utli. Bunke, *et al.* (1999) isemmi bosta mudelli li mhumiex inkluzi hawnhekk u hemm għadd kbir ta' referenzi għal mudelli oħrajn. Dawk imsemmija hawn taht huma ssuġġeriti bhala partikolarment xierqa fl-esperimenti tal-ekotossicità u jintużaw hafna.

B'5 konċentrazzjonijiet tat-test flimkien mal-kontroll

— Bruce-Versteeg

— Esponenzjali Semplici (OECD 2)

— Esponenzjali bil-parametru tal-forma (OECD 3)

— Esponenzjali Semplici b'Livell Inferjuri (OECD 4)

B'6 konċentrazzjonijiet tat-test jew aktar flimkien mal-kontroll

— Esponenzjali b'parametru tal-forma u livell inferjuri (OECD 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Fejn ikun hemm evidenza viziva ta' ormezi (mhux probabbli b'suċċess ta' tifqis tal-bajd jew sopravivenza tal-larva, iżda xi drabi osservata fl-osservazzjonijiet tad-daqs)

— Brain-Cousens Hormetic; Brain and Cousens (1989)

Mudelli alternattivi għall-falliment fit-tifqis tal-bajd u l-mortalità tal-larva

— Il-mudelli dejjem jiziedu għal dawn ir-risponsi jistgħu jiddaħhlu b'mudelli probit (jew logistiċi) jekk ma jkun hemm ebda evidenza ta' varjanza extra-binomjali u l-inċidenza tal-kontroll tkun stmata fil-mudell addattat. Dan mhuwiex il-metodu ppreferut, minhabba li jitratta l-individwu, mhux ir-replika, bhala l-unità tal-analizi (Morgan 1992, O'Hara Hines and Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

L-idoneità tal-adattament ta' mudell wahdieni

— Qabbal b'mod viziv it-tnaqqis perċentwali osservat u mbassar f'kull konċentrazzjoni tat-test (Motulsky and Christopoulos 2004, Draper and Smith 1999).

— Qabbal il-medja kwadratika tal-iżball ta' rigressjoni mal-medja kwadratika tal-iżball pur bl-użu ta' F-test (Draper and Smith 1999).

— Ivverifika li kull terminu fil-mudell huwa differenti b'mod sinifikanti minn zero (jiġifieri ddetermina jekk it-termini kollha użati fil-mudell humiex importanti), (Motulsky and Christopoulos 2004).

▼ **M7**

- Il-plotts ta' residwi minn rigressjoni kontra l-konċentrazzjoni tat-test, possibbilment fuq skala log(conc). Ma għandu jkun hemm ebda mudell għal dan il-plott; il-punti għandhom ikunu mifruxa b'mod aleatorju madwar linja orizzontali f'għoli ta' zero.
- Id-dejta għandha tiġi evalwata għan-normalità u għall-omoġeneità tal-varjanza bl-istess mod kif indikat fl-Appendiċi 5.
- Barra minn hekk, in-normalità tar-residwi dwar il-mudell ta' rigressjoni għandha tiġi vvalutata bl-użu tal-istess metodi indikati fl-Appendiċi 5 għar-residwi minn ANOVA

Qabbell il-mudelli

- Uża l-kriterji AICc ta' Akiake Valuri ta' AICc iżgħar juru adattamenti aħjar u jekk $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, il-mudell A huwa kważi ċertament aħjar mill-mudell B (Motulsky and Christopoulos (2004).
- Qabbell iż-żewġ mudelli viżwalment skont kemm jissodisfaw tajjeb il-kriterji tal-mudell wahdieni msemmija fuq.
- Huwa rrakkomandat il-prinċipju ta' parsimonja, fejn jintuża l-aktar mudell sempliċi li jkun adattat b'mod raġonevoli għad-dejta (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Stima tal-kwalità tal-EC_x

L-intervall ta' kunfidenza (confidence interval — CI) għall-EC_x ma għandux ikun wiesa' żżejjed. Huwa meħtieġ ġudizzju statistiku sabiex jiġi deċiż kemm jista' jkun wiesa' l-intervall ta' kunfidenza u l-EC_x jibqgħu utli. Is-simulazzjonijiet għall-mudelli ta' rigressjoni adattati għat-tifqis tal-bajd u d-dejta dwar id-daqs juru li madwar 75 % tal-intervalli ta' kunfidenza għal EC_x (x=10, 20 jew 30) huma mifruxa fuq mhux aktar minn żewġ konċentrazzjonijiet tat-test. Dan jipprovdi gwida ġenerali għal x'inhu aċċettabbli u gwida Prattika għal dak li jista' jinkiseb. Bosta awturi jasserixxu l-htieġa li jiġu rrapportati l-intervalli ta' kunfidenza għall-parametri tal-mudelli kollha u li l-intervalli ta' kunfidenza wiesgħa għall-parametri tal-mudelli jindikaw mudelli inaċċettabbli (Ott and Longnecker 2008, Alvord and Rossio 1993, Motulsky and Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environment Canada 2005).

Is-CI għall-EC_x (jew kwalunkwe parametru ta' mudell iehor) ma għandux jinkludi zero (Motulsky and Christopoulos 2004). Din hija r-rigressjoni ekwivalenti għad-differenza sinifikanti minima li sikwit tiġi ċċitata fl-approċċi tal-itestjar ipotetiku (eż. Wang *et al* 2000). Hija tikkorrespondi għall-intervall ta' kunfidenza sabiex ir-risponsi medji fl-LOEC ma jkunux jinkludu l-medja tal-kontroll. Wieħed għandu jistaqsi jekk l-estimi tal-parametru humiex xjentifikament plawżibbli. Pereżempju, jekk l-intervall ta' kunfidenza għal y₀ ikun ±20 %, ma hija plawżibbli ebda stima ta' EC₁₀. Jekk il-mudell jipprevedi effett ta' 20 % f'konċentrazzjoni C u l-effett massimu osservat f'C u konċentrazzjonijiet aktar baxxi jkun 10 %, mela allura l-EC₂₀ ma tkunx plawżibbli (Motulsky and Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

EC_x ma għandhiex tirrikjedi estrapolazzjoni barra l-medda ta' konċentrazzjonijiet pożittivi (Draper and Smith 1999, OECD 2006). Pereżempju, gwida ġenerali tista' tkun li l-EC_x ma tkunx aktar minn madwar 25 % taħt l-inqas konċentrazzjoni ttestjata jew aktar mill-ogħla konċentrazzjoni ttestjata.

REFERENZI

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

▼ **M7**

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC₅₀ for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. ASSAĠĠ TAR-RIPRODUZZJONI TAL-HUT FUQ ŻMIEN QASIR

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 229 tal-OECD (2012). Il-ħtieġa li jiġi żviluppat u vvalidat assaġġ tal-ħut li jkun jista' jidentifika ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali ġejja mit-ħassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkawżaw effetti avversi kemm fil-bnedmin kif ukoll fl-organizmi selvaġġi minhabba l-interazzjoni ta' dawn is-sustanzi kimiċi mas-sistema endokrinali. Fl-1998, l-OECD bdiet attività ta' prijorità għolja biex tirrevedi l-linji gwida eżistenti u tiżviluppa linji gwida ġodda għall-iskrinjar u l-ittestjar ta' sustanzi li potenzjalment ifixxlu s-sistema endokrinali. Element minnhom tal-attività kien li tiġi żviluppata linja gwida tat-test għall-iskrinjar ta' sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali tal-ispeċi tal-ħut. L-Assaġġ tar-Riproduzzjoni tal-ħut Fuq Żmien Qasir għadda minn programm estensiv ta' validazzjoni li jikkonsisti fi studji interlaboratorji b'sustanzi kimiċi magħżula biex jintwerew ir-rilevanza u l-affidabbiltà tal-assaġġ għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li jhallu impatt fuq ir-riproduzzjoni tal-ħut b'diversi mekkaniżmi, inklużi modalitajiet endokrinali (1, 2, 3, 4, 5). Il-punti tat-tmiem kollha tal-linja gwida tat-test tal-OECD ġew invalidati fuq il-karjun buras u subsett ta' punti tat-tmiem ġie vvalidat fuq il-medaka Gappuniża (jiġifieri l-vitellogenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji) u fuq iż-żebra (jiġifieri vitellogenina). Il-ħidma ta' validazzjoni ġiet riveduta permezz ta' evalwazzjoni bejn il-pari minn bord ta' esperti nnominati mill-Koordinaturi Nazzjonali tal-Programm tal-Linji Gwida tat-Test tal-OECD (6) u minn bord ta' esperti indipendenti kkummissjonati mill-Aġenzija għall-Harsien Ambjentali tal-Istati Uniti (29). L-assaġġ mhuwiex imfassal biex jidentifika mekkaniżmi speċifiċi ta' tfixkil ormonali minhabba li l-annimali tat-test għandhom assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali (HPG) intatta, li jista' jkollha rispons għal sustanzi kimiċi li għandhom impatt fuq l-assi HPG fl-livelli differenti.
2. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi assaġġ ta' skrinjar *in vivo* li fih ħut maskili sesswalment matur u ħut femminili li jkun qed ibid jinżammu flimkien u jiġu esposti għal sustanza kimika matul parti limitata miċ-ċiklu tal-ħajja tagħhom (21 jum). Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment ta' 21 jum, jitkejlu żewġ punti ta' tmiem bijomarkaturi fl-irġiel u n-nisa bħala indikaturi tal-attività endokrinali tas-sustanza kimika tat-test; dawn il-punti ta' tmiem huma l-vitellogenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji. Il-vitellogenina titkejjel fil-karjun buras, fil-medaka Gappuniża u fiż-żebra, filwaqt li l-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karjun buras u fil-medaka Gappuniża. Barra minn hekk, il-fekondità kwantitattiva tiġi mmonitorjata kuljum matul it-test. Il-gonadi jiġu ppreservati wkoll u l-istopatoloġija tista' tiġi evalwata sabiex tkun ivvalutata l-idoneità riproduttiva tal-annimali tat-test u tiżdied mal-piż tal-evidenza ta' punti tat-tmiem oħrajn.
3. Dan il-bijoassaġġ iservi bħala assaġġ ta' skrinjar riproduttiv *in vivo* u l-applikazzjoni tiegħu għandha titqies fil-kuntest tal-“Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni ta' Sustanzi Kimiċi li Jfixxlu s-Sistema Endokrinali” (30). F'dan il-Qafas Kunċettwali, l-Assaġġ tar-Riproduzzjoni Fuq Żmien Qasir huwa propost fil-Livell 3 bħala assaġġ *in vivo* li jipprovdi deġta dwar il-mekkanizmu/i jew il-passaġġ(i) endokrinali magħżula.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

4. Normalment il-vitellogenina (VTG) tiġi prodotta mill-fwied ta' vertebrati ovipari femminili bħala rispons għall-estrogenu endogenu li jkun qed jiċċirkola. Hija prekursor tal-proteini tal-isfar tal-bajd u, ladarba tiġi prodotta fil-fwied, tgħaddi mad-demem u tidhol fl-ovarji, fejn tiġi assorbita u modifikata mill-bajd li jkun qed jiżviluppa. Il-vitellogenina hija kwazi intraċċabbli fil-plażma ta' ħut femminili u maskili immaturi għaliex ma għandhomx biżżejjed estrogenu jiċċirkola; madankollu, il-fwied kapaċi jissintetizza u jnixxi l-vitellogenina bħala rispons għal stimolazzjoni tal-estrogenu eżogenu.

▼ M7

5. Il-kejl tal vitelloġenina jservi għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom diversi modi ta' azzjoni estrogenika. Id-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi estrogeniċi tista' ssir bil-kejl tal-induzzjoni tal-vitelloġenina fil-hut maskili, u għet dokumentata sew fil-letteratura xjentifika evalwata bejn il-pari (eż. (7)). L-induzzjoni tal-vitelloġenina ntweriet ukoll wara espożizzjoni għal androġeni aromatizzabbli (8, 9). Tnaqqis fil-livell ta' estrogeni li jiċċirkola fin-nisa, pereżempju, permezz tal-inibizzjoni tal-aromatażi li tikkonverti l-androġenu endoġenu f'estroġenu naturali 17 β -estradiol, jikkawża tnaqqis fil-livell ta' vitelloġenina, li jintuża għad-detezzjoni ta' sustanzi kimiċi li għandhom karatteristiċi inibitorji tal-aromatażi (10, 11). Ir-rilevanza bijoloġika tar-rispons tal-vitelloġenina wara inibizzjoni estrogenika/tal-aromatażi hija stabilita u għet iddokumentata b'mod estensiv. Madankollu, huwa possibbli wkoll li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata mit-tossiċità generali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità.
6. Ġew żviluppati b'suċċess diversi metodi ta' kejl u dawn ġew standardizzati għall-użu ta' rutina. Dan huwa l-każ fil-metodi ta' Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiċi (ELISA) speċifiċi għall-ispeċi li jużaw l-immunokimika għall-kwantifikazzjoni tal-VTG prodotta f'kampjuni żgħar tad-demm jew tal-fwied miġbura minn hut individwali (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Għall-kejl tal-VTG jittiehed kampjun tad-demm tal-karpjun buras, id-demm taż-zebra jew l-omoġenat tar-ras/demb, u l-fwied tal-medaka. Fil-medaka, hemm korrelazzjoni tajba bejn il-VTG imkejla mid-demm u mill-fwied (19). L-Appendiċi 6 jipprovdni l-proċeduri rrakkomandati għall-għbir tal-kampjuni għal analiżi tal-VTG. Kits għall-kejl tal-vitelloġenina jistgħu jinkisbu faċilment; dawn il-kits għandhom ikunu bbażati fuq metodu ELISA vvalidat li jkun speċifiku għall-ispeċi.
7. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji f'hut maskili ta' ċerti speċijiet jidhru fuq barra, huma kwantifikabbli u jirrispondu għal-livelli ta' androġeni endoġeni li jiċċirkolaw; dan huwa l-każ għall-karpjun buras u l-medaka — iżda mhux għaž-zebra, li ma għandhiex karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli. In-nisa jżommu l-kapaċità li jiżviluppaw karatteristiċi sesswali sekondarji maskili, meta jiġu esposti għal sustanzi kimiċi androġeniċi fl-ilma. Hemm bosta studji disponibbli fil-letteratura xjentifika li jiddokumentaw dan it-tip ta' rispons fil-karpjun buras (20) u fil-medaka (21). Tnaqqis fil-karatteristiċi sesswali sekondarji fl-irġiel għandu jiġi interpretat b'kawtela minhabba saħha statistika dgħajfa, u għandu jkun ibbażat fuq ġudizzju espert u l-piż tal-evidenza. Hemm limitazzjonijiet dwar l-użu taż-zebra f'dan assaġġ, minhabba n-nuqqas ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kwantifikabbli li jirrispondu għal sustanzi kimiċi b'effetti androġeniċi.
8. Fil-karpjun buras, l-indikatur ewlieni ta' esponiment androġeniku eżoġenu huwa l-għadd ta' tuberkuli tan-namra (nuptial tubercles) li jinsabu fuq imnieher il-huta femminili. Fil-medaka, l-għadd ta' proċessi papillari jikkositwixxi l-markatur ewlieni ta' esponiment eżoġenu għal sustanzi kimiċi androġeniċi f'hut femminili. L-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B jindikaw il-proċeduri rrakkomandati li għandhom jiġu segwiti għall-evalwazzjoni tal-karatteristiċi sesswali fil-karpjun buras u fil-medaka, rispettivament.
9. L-assaġġ ta' 21 jum jinkludi l-evalwazzjoni tal-produzzjoni kwantitattiva tal-bajd u l-preservazzjoni tal-gonadi għal eżaminazzjoni fakultattiva tal-istopatoloġija. Xi awtoritajiet regolatorji jistgħu jirrikjedu dan il-punt ta' tmiem addizzjonali għal evalwazzjoni aktar shiha tal-idoneità riproduttiva tal-annimali tat-test, jew f'dawk il-każijiet fejn il-vitelloġenina u l-karatteristiċi sesswali sekondarji ma rrispondewx għall-esponiment kimiku. Għalkemm xi punti ta' tmiem jistgħu jkunu dijanjostiċi hafna (eż. induzzjoni tal-VTG fl-irġiel u formazzjoni tat-tuberkuli fin-nisa), mhux il-punti tat-tmiem kollha (eż. fekondità u istopatoloġija gonadali) fl-assaġġ huma mahsuba biex jidentifikaw b'mod inekwivoku l-mekkaniżmi ċellulari speċifiċi ta' azzjoni. Minflok, il-firxa ta' punti ta' tmiem, b'mod kollettiv, tippermetti li jsiru

▼ M7

inferenzi fir-rigward tad-disturbanzi endokrinali possibbli u, b'hekk, tipprovdi gwida ghal aktar ittestjar. Ghalkemm mhijiex speċifika għall-endokrini, il-fekondità, minhabba s-sensittività murija minnha fost is-sustanzi kimiċi attivi endokrinali magħrufa (5), hija punt ta' tmiem importanti li jrid jiġi inkluż, minhabba li meta dan u punti ta' tmiem oħrajn ma jkunux affettwati, wiehed huwa aktar kunfidenti li kompost mhux probabbli jkun attiv fis-sistema endokrinali. Madankollu, meta l-fekondità tkun affettwata, hija tikkontribwixxi għall-inferenzi fil-piż tal-evidenza. F'dan il-metodu ta' ttestjar hija pprovduta gwida dwar l-interpretazzjoni tad-dejta u l-aċċettazzjoni tar-riżultati tat-test.

10. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma mogħtija fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Fl-assaġġ, il-hut maskili u dawk femminili li jkunu fi stat riproduttiv jiġu esposti f'reċipjenti tat-test flimkien. L-istat adult u riproduttiv tagħhom jippermetti sabiex issir differenzjazzjoni ċara bejn is-sessi, u b'hekk tkun tista' ssir analiżi relatata mas-sess ta' kull punt ta' tmiem, u jiżgura s-sensittività tagħhom lejn sustanzi kimiċi esoġeni. Fi tmiem it-test, is-sess jiġi kkonfermat permezz ta' eżami makroskopiku tal-gonadi wara ftuħ ventrali tal-addome b'imqass. Fl-Appendiċi 2 tingħata harsa ġenerali lejn il-kundizzjonijiet rilevanti tal-bijoassaġġ. Normalment, l-assaġġ jinbeda b'kampjun ta' hut minn popolazzjoni li tkun f'kundizzjoni riproduttiva; ma għandhomx jintużaw annimali li qed jixxju. Fis-sezzjoni dwar l-Għażla tal-hut hija pprovduta gwida dwar l-età tal-hut u dwar l-istatus riproduttiv. L-assaġġ isir permezz ta' tliet konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi li jintużaw għall-espożizzjoni kif ukoll kontroll tal-ilma, u kontroll tas-solvent jekk ikun hemm bżonn. Għaż-żebra jintużaw żewġ reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 5 irġiel u 5 nisa). Għall-karpjun buras jintużaw erba' reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 2 irġiel u 4 nisa). Dan isir biex tiġi akkomodata l-imġiba territorjali tal-karpjun buras maskili filwaqt li jinżamm assaġġ b'saħħtu biżżejjed. Għall-medaka jintużaw erba' reċipjenti jew repliki għal kull trattament (kull reċipjent ikun fih 3 irġiel u 3 nisa). L-espożizzjoni ssir għal 21 jum u l-kampjunar tal-hut isir fil-21 jum tal-esponiment. Il-fekondità kwantitattiva tiġi mmonitortjata kuljum.
12. Mal-kampjunar fil-jum 21, l-annimali kollha jinqatlu bla tbatija. Il-karatteristiċi sesswali sekondarji jitkejlu fil-karpjun buras u fil-medaka (ara l-Appendiċi 5A u l-Appendiċi 5B); fiż-żebra u l-karpjun buras jingabru kampjuni tad-demem għad-determinazzjoni tal-vitellogenina, inkella jistgħu jingabru r-ras/id-denb għad-determinazzjoni tal-vitellogenina fiż-żebra (Appendiċi 6); fil-medaka, il-fwied jingabar għall-analiżi tal-VTG (Appendiċi 6); il-gonadi jinżammu jew magħqudin flimkien bħala haġa shiha jew inkella mifrudin għal evalwazzjoni istopatoloġika potenzjali (22).

IL-KRITERJI TA' AĊĊETTAZZJONI TAT-TEST

13. Biex ir-riżultati tat-test ikunu aċċettabbli, japplikaw il-kundizzjonijiet li ġejjin:
- il-mortalità fil-kontrolli tal-ilma (jew tas-solvent) ma għandhiex taqbeż l-10 fil-mija fi tmiem il-perjodu ta' esponiment;
 - matul il-perjodu ta' esponiment, il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu dissolt għandha tilhaq minimu ta' 60 fil-mija tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja (ASV);
 - it-temperatura tal-ilma ma għandhiex tvarja b'aktar minn $\pm 1,5$ °C bejn ir-reċipjenti tat-test fi kwalunkwe hin matul il-perjodu ta' esponiment u għandha tinżamm fi hdan 2 °C tal-meded tat-temperaturi speċifikati għall-ispeċi tat-test (Appendiċi 2);
 - għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi hdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla;

▼ **M7**

- evidenza li l-hut qed jirriproduci b'mod attiv fir-repliki kollha qabel Jinbada esponiment kimiku u fir-repliki ta' kontroll matul it-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU**Apparat**

14. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

- a. ossiġenometri u apparati li jkejlu l-pH;
- b. tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u l-alkalinità tal-ilma;
- c. apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;
- d. tankijiet magħmulin minn materjal kimiku inert u ta' kapaċità adattata b'rabta mad-densità rrakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 2);
- e. sottostrat tal-bidien għall-karpu buras u ż-żebra, l-Appendiċi 4 jagħti d-dettalji neċessarji.
- f. bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa $\pm 0.5\text{mg}$).

Ilma

15. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuza bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6.5 sa 8.5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' ± 0.5 unitajiet tal-pH. Sabiex jiġi żgurat li l-ilma tad-dilwizzjoni ma jinfluwenzax bla bżonn ir-riżultat tat-test (pereżempju billi jbidel is-sustanza kimika tat-test); għandhom jittiehdu kampjuni f'intervalli sabiex jiġu analizzati. Għandu jsir il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Cl^{-} u SO_4^{2-}), il-pestiċidi (eż. pestiċidi organofosforiċi totali u pestiċidi organokloriniċi totali), il-karbonju organiku totali u s-solidi sospizi, pereżempju, kull tliet xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li huwa relativament kostanti fil-kwalità. Jekk ikun intwera li l-kwalità tal-ilma hija kostanti matul tal-anqas sena, id-determinazzjonijiet jistgħu jkunu inqas spissi u l-intervalli jistgħu jittawlu (eż. kull sitt xhur). Xi karatteristiċi kimiċi ta' ilma b'dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 3.

Is-soluzzjonijiet tat-test

16. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħzula jiġu preparati billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Idealment, is-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi ppreparata permezz ta' sempliċi thallit jew theżżiz tas-sustanza kimika tat-test f'ilma tad-dilwizzjoni bl-użu ta' mezzi mekkaniċi (eż. thawwid jew ultrasonikazzjoni). Biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija konċentrata adegwata jistgħu jintużaw kolonni ta' saturazzjoni (kolonni ta' solubilità). L-użu ta' portatur ta' solvent mhuwiex rakkomandat. Madankollu, f'każ li jkun hemm bżonn ta' solvent, fl-istess hin għandu jsir kontroll tas-solvent, fl-istess konċentrazzjoni tas-solvent bħat-trattamenti kimiċi; Għal sustanzi kimiċi li diffiċli jiġu ttestjati, solvent jista' teknikament ikun l-ahjar soluzzjoni; għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-ittestjar tat-tossiċità akwatika ta' sustanzi u tahlitiet diffiċli (23). L-għażla tas-solvent tiġi ddeterminata mill-proprietajiet kimiċi tas-sustanza jew tat-tahlita. Id-Dokument ta' Gwida tal-OECD jirrakkomanda massimu ta' $100\mu\text{l/l}$, li għandu jiġi osservat. Madankollu, revizzjoni riċenti (24) enfasizzat fuq thassib addizzjonali meta jintużaw solventi għall-ittestjar tal-attività fis-sistema endokrinali. Għalhekk, huwa rakkomandat li l-konċentrazzjoni tas-solvent, jekk ikun meħtieġ, tiġi minimizzata meta dan ikun teknikament fattibbli (skont il-proprietajiet fiżiokimiċi tas-sustanza kimika tat-test).

▼ **M7**

17. Għandha tintuża sistema ta' test bi fluss kontinwu. Sistema b'hal din tiddistribwixxi u tiddilwixxi b'mod kontinwu soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test (eż. pompa tal-kejl, dilwitur proporzjonali, sistema ta' saturazzjoni) sabiex twassal serje ta' konċentrazzjonijiet fil-kompartimenti tat-test. Ir-rati tal-fluss tas-soluzzjonijiet ewlenin u tal-ilma tad-dilwizzjoni għandhom jiġu ċċekkjati kull ċertu żmien, idealment kuljum, matul it-test u m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat l-użu ta' tubi tal-plastik ta' grad baxx jew materjal ieħor li jista' jkun fih sustanzi kimiċi bijoloġikament attivi. Meta jkun qed jintgħażel il-materjal għas-sistema bi fluss kontinwu, għandha titqies il-possibilità li s-sustanza kimika tat-test tiġi adsorbita f'dan il-materjal.

Iż-żamma tal-hut

18. Il-hut tat-test għandu jintgħażel minn popolazzjoni tal-laboratorju, idealment minn stokk wiehed, li jkun idderra għal mill-inqas ġimgħatejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test. Importanti li r-rata tat-tagħbija u d-densità tal-istokkjar (għad-definizzjonijiet, ara l-Appendiċi 1) jkunu xierqa għall-ispeċi tat-test użata (ara l-Appendiċi 2).

19. Wara perjodu ta' 48 siegħa li fih il-hut jithallew joqogħdu, jiġu rreġistrati l-mortalitajiet u jiġu applikati l-kriterji li ġejjin:

— mortalitajiet ta' aktar minn 10 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: jintrema l-lott kollu;

— mortalitajiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni: akklimatizzazzjoni għal sebat ijiem oħra; jekk ikun hemm mortalità oġġla minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, il-lott kollu jitwarrab;

— mortalitajiet ta' inqas minn 5 % tal-popolazzjoni f'sebat ijiem: il-lott jiġi aċċettat.

20. Matul il-perjodu ta' akklimatizzazzjoni, fil-perjodu ta' qabel l-esponiment, jew matul il-perjodu ta' esponiment l-hut m'għandux jingħata kura għal mard.

Perjodu ta' qabel l-esponiment u l-għażla tal-hut

21. Il-perjodu ta' qabel l-esponiment ta' bejn ġimgħa u ġimgħatejn huwa rrakkomandat għall-annimali mqiegħda f'reċipjenti simili għat-test proprju. Matul il-perjodu ta' żamma u matul il-fażi ta' esponiment, il-hut għandu jiġi mitmugħ *ad libitum*. Il-fażi ta' esponiment tinbeda b'hut adult sesswalment dimorfiku minn provvista tal-laboratorju ta' annimali maturi biżżejjed għar-riproduzzjoni (eż. b'karatteristiċi sesswali sekondarji li jidhru fir-rigward tal-karpjun buras u l-medaka), u li jkunu qed ibidu b'mod attiv. Għal gwida ġenerali biss (u dan ma għandux jittqies mingħajr l-osservazzjoni tal-istatus riproduttiv propju ta' lott partikolari ta' hut), il-karpjuni buras għandu jkollhom madwar $20 (\pm 2)$ ġimgħa, jekk wiehed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul haġjithom. Il-medaka Gappuniza għandu jkollha madwar $16 (\pm 2)$ il-ġimgħa, jekk wiehed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 25 ± 2 °C matul haġjithom. Iz-zebra għandu jkollha madwar $16 (\pm 2)$ il-ġimgħa, jekk wiehed jassumi li jkunu ġew ikkulturati f'temperatura ta' 26 ± 2 °C matul haġjithom. Il-produzzjoni tal-bajd għandha tiġi vvalutata kuljum matul il-fażi ta' qabel l-esponiment. Huwa rrakkomandat li r-riproduzzjoni tiġi osservata fit-tankijiet irreplikati kollha qabel l-inkluzjoni fil-fażi tal-esponiment tal-assaġġ. F'dan l-istadju, ma tistax tiġi pprovduta gwida kwantitativa dwar il-produzzjoni tal-bajd mixtieqa ta' kuljum, iżda huwa relattivament komuni li jiġu osservati bidien medji ta' > 10 bajdiet/femminili/jum għal kull speċi. Għandu jintuża disinn bi blokki aleatorji skont l-output tal-produzzjoni tal-bajd sabiex jiġu allokat i repliki għad-diversi livelli sperimentali bil-ghan li tiġi żgurata distribuzzjoni bilanċjata tar-repliki.

▼ **M7****ID-DISINN TAT-TEST**

22. Jintużaw tliet konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, kontroll wiehed (tal-ilma) u, jekk ikun hemm bżonn, kontroll tas-solvent. Id-dejta tista' tiġi analizzata sabiex jiġu determinati differenzi statistikament sinifikanti bejn ir-risponsi għat-trattament u għall-kontroll. Dawn l-analizijiet ser jindikaw jekk hemmx il-hteġa ta' ittestjar ulterjuri aktar fit-tul għal effetti avversi (jiġifieri, is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u r-riproduzzjoni) għas-sustanza kimika, aktar milli għall-użu fil-valutazzjoni tar-riskju (25).
23. Għaž-zebra, fil-jum 21 tal-esperiment, jittiehdu kampjuni ta' rġiel u nisa minn kull livell ta' trattament (5 irġiel u 5 nisa f'kull wiehed miż-żewġ repliki) u mill-kontroll(i) għall-kejl tal-vitellogenina. Għall-medaka, fil-jum 21 tal-esperiment, jittiehdu kampjuni ta' rġiel u nisa minn kull livell ta' trattament (3 irġiel u 3 nisa f'kull wiehed mill-erba' repliki) u mill-kontroll(i) għall-kejl tal-vitellogenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji. Għall-karpjun buras, fil-jum 21 ta' esponiment, l-irġiel u n-nisa (2 irġiel u 4 nisa f'kull wiehed mill-erba' repliki) u mill-kontroll(i) jiġu kampjunati għall-kejl tal-vitellogenina u tal-karatteristiċi sesswali sekondarji. Hija meħtieġa valutazzjoni kwantitattiva tal-fekondità u t-tessuti gonadali għandhom jitqieghdu shah jew mifrudin tkun tista' ssir evalwazzjoni istopatoloġika, jekk tkun meħtieġa.

L-ghażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test

24. Għall-finijiet ta' dan it-test, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tiġi stabbiliti mill-konċentrazzjoni massima tollerata (MTC) li tiġi ddeterminata minn range finder jew minn dejta oħra dwar it-tossicità, jew 10 mg/l, jew is-solubilità massima fl-ilma, skont liema tkun l-aktar baxxa. L-MTC hija definita bħala l-ogħla konċentrazzjoni tat-test tas-sustanza kimika li twassal għal mortalità ta' inqas minn 10 %. L-użu ta' dan l-approċċ jassumi li teżisti dejta empirika dwar tossicità akuta jew dejta oħra dwar it-tossicità li minnha tista' tiġi stmata l-MTC. L-istima tal-MTC tista' ma tkunx eżatta u normalment teħtieġ ċertu ġudizzju professjonali.
25. Huma meħtieġa tliet konċentrazzjonijiet tat-test, spazjati b'fattur kostanti li ma jaqbix 1-10, u kontroll ta' ilma tad-dilwizzjoni (u kontroll tas-solvent jekk ikun meħtieġ). Huwa rrakkomandat li l-fatturi ta' spazjar jkunu f'firxa ta' bejn 3.2 u 10.

PROCEDURA**L-ghażla u l-użin tal-hut tat-test**

26. Huwa importanti li fil-bidu tal-assaġġ tiġi minimizzata l-varjazzjoni fil-piż tal-hut. Il-medet ta' daqsijiet adattati għall-ispeċi differenti rrakkomandati għall-użu f'dan it-test huma mogħtija fl-Appendiċi 2. Għal-lott kollu ta' hut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali għall-hut maskili u femminili fil-bidu tat-test għandha, jekk possibbli, tinżamm bejn $\pm 20\%$ tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Huwa rrakkomandat li qabel it-test jintiżen sottokampjun tal-istokk tal-hut sabiex jiġi stmat il-piż medju.

Kundizzjonijiet tal-Esponiment*Durata*

27. It-test idum għaddej 21 jum, wara perjodu ta' qabel l-esponiment. Il-perjodu ta' qabel l-esponiment rrakkomandat huwa ta' bejn ġimgha u ġimghatejn.

Tmigh

28. Il-hut għandu jiġi mitmugħ *ad libitum* b'ikel addattat (Appendiċi 2) b'rata suffiċjenti biex tinżamm il-kundizzjoni tal-ġisem. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġi evitat tkabbir mikrobiku u turbidità fl-ilma. Bħala gwida ġenerali, ir-razzjon ta' kuljum jista' jinqasam f'żewġ jew tliet porzjonijiet ugwali

▼ **M7**

ghal tmigh multiplu kuljum, separat b'mill-inqas tliet sigħat bejn kull tmigh. Huwa aċċettabbli li jingħata razzjon akbar uniku b'mod partikolari għal tmiem il-ġimgha. Il-hut m'għandux jingħata x'jiekol għal 12-il siegħa qabel il-kampjunar/nekroskopija.

29. L-ikel tal-hut għandu jiġi evalwat għall-preżenza ta' kontaminanti bħal pestiċidi organokloriniċi, idrokarboni aromatiċi policiċliċi (PAHs), bifenili poliklorinati (PCBs). Għandu jiġi evitat ikel b'livell għoli ta' fitoestrogeni li jista' jikkomprometti r-rispons tal-assaġġ għal agonisti magħrufa tal-estrogeni (eż. 17 β -estradiol).
30. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandu jitneħħa mir-riċipjent tat-test tal-inqas darbtejn fil-ġimgha, eż. billi l-qiegħ ta' kull tank jitnaddaf sew permezz ta' sifun.

Id-dawl u t-temperatura

31. Il-fotoperjodu u t-temperatura tal-ilma għandhom ikunu adattati għall-ispeċi tat-test (ara Appendiċi 2).

Il-Frekwenza tal-Kejl u d-Determinazzjonijiet Analitiċi

32. Qabel jibda l-perjodu ta' qabel l-esponiment, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi kollha meħtieġa, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabilità kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli regolari, kif ġej: preferibbilment, ir-rati tal-fluss tas-soluzzjoni ewlenija dilwenti u tossikanti għandhom jiġu vverifikati kuljum, iżda mill-inqas darbtejn fil-ġimgha, u ma għandhomx ivarjaw b'aktar minn 10 % matul it-test. Huwa rrakkomandat li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test innifsu jitkejlu fir-riċipjenti kollha fil-bidu tat-test u f'intervalli ta' ġimgha wara dan.
33. Huwa rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla.
34. Il-kampjuni jistgħu jeħtieġu jiġu ffiltrati (eż. bl-użu ta' pori ta' $\mu 0.45$ μ m) jew jiġu ċentrifugati. Jekk ikun hemm bżonn, imbagħad iċ-ċentrifugazzjoni hija l-proċedura rrakkomandata. Madankollu, jekk il-materjal tat-test ma jiġix adsorbit mill-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll.
35. Matul it-test, l-ossigeno dissolt, it-temperatura, u l-pH għandhom jitkejlu fir-riċipjenti kollha tat-test tal-inqas darba fil-ġimgha. L-ebusija u l-alkalinità totali għandhom jitkejlu fil-kontrolli u f'reċipjent wieħed fl-ogħla konċentrazzjoni tal-anqas darba fil-ġimgha. Idealment, it-temperatura għandha tiġi ssorveljata kontinwament f'mill-inqas reċipjent wieħed tat-test.

Osservazzjonijiet

36. Għadd ta' risponsi ġenerali (eż. sopravivenza) u risponsi bijoloġiċi ewlenin (eż. il-livelli tal-vitellogenina) jiġu vvalutati matul l-assaġġ jew fi tmiem l-assaġġ. Jeħtieġ li kuljum isir il-monitoraġġ kwantitattiv tal-fekondità. Il-kejl u l-valutazzjoni ta' dawn il-punti ta' tmiem u l-utilità tagħhom huma deskritti hawn taht.

Sopravivenza

37. Matul il-perjodu tat-test, il-hut għandu jiġi eżaminat kuljum u kwalunkwe mortalità għandha tiġi rreġistrata u l-hut mejjet għandu jitneħħa malajr kemm jista' jkun. Il-hut mejjet m'għandux jiġi sostitwit la fir-riċipjent tal-kontroll u lanqas fir-riċipjent tat-trattament. Is-sess tal-hut li jmut matul it-test għandu jiġi determinat permezz ta' evalwazzjoni makroskopika tal-gonadi.

▼ M7

Imġiba u dehra

38. Għandha tittiehed nota ta' kwalunkwe mġiba abnormali (relatata mal-kontrolli); din tista' tinkludi sinjali ta' tossiċità ġenerali inklużi iperventilazzjoni, għawm mhux ikkoordinat, telf tal-bilanċ u inattività jew tmigh mhux tas-soltu. Barra minn hekk għandha tittiehed nota ta' anormalitajiet esterni (bħal emorragija, skolorazzjoni). Dawn is-sinjali ta' tossiċità għandhom jiġu kkunsidrati bir-reqqa waqt l-interpretazzjoni tad-dejta peress li jistgħu jindikaw konċentrazzjonijiet li fihom il-bijomarkaturi ta' attività endokrinali ma jkunux affidabbli. Dawn l-osservazzjonijiet tal-imġiba jistgħu anke jipprovdut informazzjoni kwalitattiva biex jinkiseb tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-hut. Pereżempju, fil-karppuni buras, f'irġiel normali jew f'nisa b'karatteristiċi maskili giet osservata aggressività territorjali matul esponiment androgeniku; fiż-żebra, l-imġiba karatteristika ta' tghammir u riproduzzjoni wara li jinxteghel id-dawl tiddgħajef jew tiġi mfixkla minn esponiment estrogeniku jew antiandrogeniku.
39. Billi xi aspetti tad-dehra (primarjament il-kulur) jistgħu jinbidlu malajr bit-tqandil, importanti li l-osservazzjonijiet kwalitattivi jsiru qabel ma l-annimali jitnehhew mis-sistema tat-test. L-esperjenza miksba sa issa bil-karppuni buras tissuggerixxi li, għall-ewwel, xi sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi esterni li ġejjin: il-kulur tal-ġisem (ċar jew skur), mudelli ta' kolorazzjoni (il-preżenza ta' strixxi vertikali) u l-forma tal-ġisem (ir-ras u r-regjun pettorali). Għalhekk, l-osservazzjonijiet dwar id-dehra fiżika tal-hut għandhom isiru matul it-test, u fi tmiem l-istudju

Fekondità

40. L-osservazzjonijiet kwantitattivi ta' kuljum tar-riproduzzjoni għandhom jiġu rreġistrati fuq bażi rreplikata. Il-produttjoni tal-bajd għandha tiġi rreġistrata bħala l-għadd ta' bajd/nisa li jibqgħu haġġin/jum fuq bażi rreplikata. Il-bajd jitneħħa kuljum mill-kompartimenti tat-test. Is-sottostrati riproduttivi għandhom jitqiegħdu fil-kompartimenti tat-test għall-karppun buras u għaž-żebra sabiex il-hut ikun jista' jbid f'kundizzjonijiet normali. L-Appendiċi 4 jagħti aktar dettalji tas-sottostrati riproduttivi għaž-żebra (Appendiċi 4A) u għall-karppun buras (Appendiċi 4B). Mhuwiex meqjus bħala neċessarju li jiġi pprovdut sottostrat riproduttiv għall-medaka.

Il-qtil bla tbatija tal-hut

41. Fil-jum 21, jiġifieri fi tmiem l-esponiment, il-hut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' Trikaina (Triakaina metan sulfonat, Metakaina, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l ibbaferjat bi 300 mg/l NaHCO₃ (bikarbonat tas-sodju, CAS.144-55-8) biex tinnaqqas l-irritazzjoni fil-membrana mukuża; imbagħad jittiehed kampjun tad-demem jew tat-tessut għad-determinazzjoni tal-vitellogenina, kif spjegat fis-sezzjoni tal-vitellogenina.

Osservazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji

42. Ċerti sustanzi kimiċi attivi fis-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw tibdil fil-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (l-għadd ta' tuberkuli tan-namra fil-karppun buras maskili, il-proċessi papillari fil-medaka maskili). B'mod partikolari, sustanzi kimiċi li jkollhom ċerti modi ta' azzjoni jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fl-annimali tas-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal trenbolon, metiltestosteron u diidrottestosteron, jistgħu jwasslu sabiex il-karppuni buras femminili jiżviluppaw tuberkuli tan-namra prominenti jew sabiex il-medaka femminili tiżviluppa proċessi papillari (11, 20, 21). Gie rrapportat ukoll li l-agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-għadd tat-tuberkuli tan-namra u d-daqs tal-kuxxinett tal-kożz dorsali f'irġiel adulti ta'

▼ M7

karpjun buras (26, 27). Dawn l-osservazzjonijiet morfologiċi grossi jistgħu jipprovdu tagħrif kwalitattiv u kwantitattiv siewi biex jingħata tagħrif dwar rekwiżiti futuri potenzjali għall-ittestjar tal-hut. L-għadd u d-daqs tat-tuber-kuli tan-namra fil-karpjun buras u l-proċessi papillari fil-medaka jistgħu jiġu kkwantifikati b'mod dirett jew b'mod aktar prattiku f'kampjuni ppreservati. Il-proċeduri rrakkomandati għall-evalwazzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karpjun buras u fil-medaka huma disponibbli mill-Appendiċi 5A u mill-Appendiċi 5B, rispettivament.

Vitellogenina (VTG)

43. Id-demm jingħabar mill-arterja/vina kawdali permezz ta' tubulu kapillari mikroematokritiku eparinizzat, jew inkella permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa. Skont kemm hi kbira l-huta, il-volumi tad-demmi li jistgħu jingħabru ġeneralment iwarjaw bejn 5 u 60 μ l għal kull ħuta individwali għall-karpjuni buras u minn 5-15 μ l għal kull ħuta individwali għaž-żebra. Il-plażma tiġi separata mid-demmi permezz ta' ċentrifugazzjoni, u tinhażen ma' inibituri tal-proteazi f'temperatura ta' -80°C , sakemm tiġi analizzata għall-vitellogenina. Inkella, fil-medaka jintuza l-fwied, u fiż-żebra jista' jintuza l-omoġenat tar-ras/denb bħala sors ta' tessuti għad-determinazzjoni tal-vitellogenina (Appendiċi 6). Il-kejl tal-VTG għandu jkun imsejjes fuq metodu ELISA omologu vvalidat, bl-użu ta' standard omologu tal-VTG u antikorpi omologi. Huwa rrakkomandat li jintuza metodu li jkun kapaċi jiskopri livelli ta' VTG baxxi daqs f'tit ng/ml fil-plażma (jew ng/mg fit-tessut), li huwa l-livell ta' sfond f'ħut maskili li ma jkunx ġie espost.
44. Il-kontroll tal-kwalità tal-analiżi tal-vitellogenina jintlaħaq permezz tal-użu ta' standards, bjanki u mill-inqas analizzijiet duplikati. Għal kull metodu ELISA, għandu jsir test għall-effett matriċi (effett ta' dilwizzjoni ta' kampjun) biex jiġi determinat il-fattur minimu tad-dilwizzjoni tal-kampjun. Kull platt ELISA li jintuza għall-assaġġi tal-VTG għandu jinkludi l-kampjuni tal-kontroll tal-kwalità li ġejjin: mill-inqas 6 standards ta' kalibrazzjoni li jkopru l-firxa ta' konċentrazzjonijiet mistennija tal-vitellogenina u mill-inqas bjank tal-assaġġ vinkolanti mhux speċifiku wieħed (analizi duplikata). L-assorbiment ta' dawn il-bjanki għandu jkun ta' anqas minn 5 % tal-assorbiment standard massimu ta' kalibrazzjoni. Minn kull kampjun ta' dilwizzjoni jiġu analizzati tal-anqas żewġ alikwoti (well-duplicates). Well-duplicates li jvarjaw b'aktar minn 20 % għandhom jerġgħu jiġu analizzati.
45. Il-koeffiċjent tal-korrelazzjoni (R^2) għall-kurvi ta' kalibrazzjoni għandu jkun ta' aktar minn 0.99. Madankollu, korrelazzjoni għolja mhijiex biżżejjed biex tiggarantixxi tħassir adegwat tal-konċentrazzjoni fil-meded kollha. Minbarra li jkun hemm korrelazzjoni għolja biżżejjed għall-kurva ta' kalibrazzjoni, il-konċentrazzjoni ta' kull standard, kif ikkalkolata mill-kurva ta' kalibrazzjoni, dejjem għandha taqa' bejn 70 u 120 % tal-konċentrazzjoni nominali tiegħu. Jekk il-konċentrazzjonijiet nominali jxaqilbu lil hinn mil-linja ta' rigressjoni tal-kalibrazzjoni (eż. f'konċentrazzjonijiet inqas), jista' jkun hemm bżonn li l-kurva ta' kalibrazzjoni tinqasam f'meded baxxi u għoljin jew li jintuza mudell nonlineari li jaqbel b'mod adegwat mad-dejta dwar l-assorbiment. Jekk il-kurva tinqasam, iż-żewġ segmenti tal-linja għandu jkollhom $R^2 > 0.99$.
46. Il-limitu ta' detezzjoni (LOD) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku, u l-limitu ta' kwantitazzjoni (LOQ) huwa definit bħala l-konċentrazzjoni tal-inqas standard analitiku mmultiplikata bl-inqas fattur ta' dilwizzjoni.
47. F'kull jum li fihi isiru l-assaġġi tal-vitellogenina għandu jiġi analizzat kampjun ta' fortifikazzjoni permezz ta' standard ta' referenza interassaġġi (Appendiċi 7). Il-proporzjon tal-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejja jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

Evalwazzjoni tal-istopatoloġija gonadali

48. Jista' jkun meħtieġ li ssir istopatoloġija gonadali mill-awtoritajiet regolatorji sabiex ikunu jistgħu jistudjaw l-organu fil-mira fuq l-assi tal-HPG wara l-esponiment kimiku. F'dan ir-rigward, il-gonadi jitqieghdu shah jew dissezzjonati. Meta tkun meħtieġa istopatoloġija, għandhom jiġu mfittxija risponsi endokrinali speċifiċi fuq il-gonadi fil-valutazzjoni tal-attività endokrinali tas-sustanza kimika tat-test. Dawn ir-risponsi dijanjostiċi essenzjalment jinkludu

▼ **M7**

l-preżenza ta' oociti testikulari, iperplażja taċ-ċellula Leydig, tnaqqis fil-formazzjoni tal-isfar tal-bajd, zieda fl-ispermatoġoni u iperplażja perifollikulari. Leżjonijiet gonadali oħrajn, bħal atreżja tal-oociti, diġenerazzjoni testikulari u bidliet fl-istadji, jista' jkollhom diversi kawżi. Id-dokument ta' Gwida dwar l-istopatoloġija gonadali tal-hut jispeċifika l-proċeduri li jintużaw fid-dissezzjoni, il-fissazzjoni, is-sezzjonar u l-evalwazzjoni istopatoloġika tal-gonadi (22).

DEJTA U RAPPORTAR**Valutazzjoni tar-Risponsi tal-Bijomarkatur permezz ta' Analizi tal-Varjanza (ANOVA)**

49. Biex tiġi identifikata l-attività endokrinali potenzjali ta' sustanza kimika, ir-risponsi jitqabblu bejn il-gruppi ta' trattament u ta' kontroll permezz ta' analizi tal-varjanza (ANOVA). Meta jintuża kontroll tas-solvent, għandu jsir test statistiku xieraq bejn il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u l-kontroll tas-solvent għal kull punt ta' tmiem. Gwida dwar kif tittratta d-dejta dwar il-kontroll tal-ilma tad-dilwizzjoni u tas-solvent fl-analizi statistika sussegwenti tista' tinstab fl-OECD, 2006c (28). Id-dejta kollha dwar ir-rispons bijoloġiku għandha tiġi analizzata u rrapportata separatament skont is-sess. Jekk ma jintlaħqux is-suppożizzjonijiet meħtieġa għall-metodi parametriċi — distribuzzjoni mhux normali (eż. it-test ta' Shapiro-Wilk) jew varjanza eteroġena (it-test ta' Bartlett jew it-test ta' Levene), għandha tiġi kkunsidrata l-possibiltà li d-dejta tiġi konvertita f'varjanzi omoġenizzati qabel ma ssir l-ANOVA, jew qabel ma ssir ANOVA ponderata. It-test ta' Dunnett (parametrik) fuq tqabbiliet multipli bejn pari jew it-test ta' Mann-Whitney b'agġustament Bonferroni (mhux parametrik) jista' jintuża għal rispons mhux monotonu għad-doża. Jekk ir-rispons għad-doża ikun kważi monotonu jistgħu jintużaw testijiet statistiċi oħra (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra jew it-test ta' Williams). Fl-Appendiċi 8 giet ipprovduta flowchart statistika biex tgħin fid-deċiżjoni dwar l-aktar test statistiku xieraq li għandu jintuża. Tagħrif addizzjonali jista' jinkiseb ukoll mid-Dokument tal-OECD dwar Approċċi Attwali lejn l-Analizi Statistika ta' Dejta dwar l-Ekotożiċità (28).

Rappurtar tar-riżultati tat-test

50. Id-dejta tal-istudju għandha tinkludi:

Il-faċilità tal-ittejtjar:

- Il-personal responsabbli u r-responsabilitajiet tal-istudju tiegħu,
- Kull laboratorju għandu jkun wera profiċjenza fl-użu ta' firxa ta' sustanzi kimiċi rappreżentattivi

Sustanza kimika tat-test:

- Karatterizzazzjoni tas-sustanza kimika tat-test
- In-natura fiżika u l-proprietajiet fiżikokimiċi rilevanti
- Il-metodu u l-frekwenza tal-preparazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tat-test
- Informazzjoni dwar l-istabbiltà u l-bijodegradabilità

Solvent:

- Il-karatterizzazzjoni tas-solvent (in-natura, il-konċentrazzjoni użata)
- Ġustifikazzjoni tal-għażla tas-solvent (jekk ma jkunx ilma)

▼ **M7***Annimali tat-test:*

- L-ispeċi u r-razza
- Il-fornitur u l-faċilità speċifika tal-fornitur,
- L-età tal-ħut fil-bidu tat-test u l-istatus ta' riproduzzjoni
- Dettalji tal-proċedura ta' akklimatizzazzjoni tal-annimali
- Il-piż tal-ġisem tal-ħut fil-bidu tal-esponiment (minn sottokampjun tal-istokk tal-ħut)

Kundizzjonijiet tat-test:

- Il-proċedura tat-test użata (it-tip tat-test, ir-rata tat-tagħbija, id-densità tal-istokkjar, eċċ.);
- Il-metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u r-rata tal-fluss;
- Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-konċentrazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test imkejla kull ġimgħa u l-metodu analitiku użat, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard fir-reċipjenti tat-test u evidenza li l-kejl jirreferi għall-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni vera;
- Il-karatteristiċi tal-ilma tad-dilwizzjoni (inkluż il-pH, l-ebusija, l-alkalinità, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossigenu dissolt, il-livelli ta' klorin residwu, il-karbonju organiku totali, is-solidi sospiżi u kwalunkwe kejl ieħor li jkun sar)
- Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test: il-pH, l-ebusija, it-temperatura u l-konċentrazzjoni tal-ossigenu dissolt;
- Informazzjoni ddettaljata dwar it-tmiġħ (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont li ngħata u l-frekwenza u analizijiet għal kontaminanti rilevanti jekk disponibbli (eż. PCBs, PAHs u pesticidi organoklorurati).

Riżultati

- Evidenza li l-kontrolli jissodisfaw il-kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test;
- Dejta dwar il-mortalitajiet li jseħħu fi kwalunkwe konċentrazzjoni tat-test u fil-kontrolli;
- Tekniki analitiċi statistiċi użati, it-trattament tad-dejta u ġustifikazzjoni tat-tekniki użati;
- Dejta dwar osservazzjonijiet bijoloġiċi ta' morfologija grossa, inklużi l-karatteristiċi sesswali sekondarji, il-produzzjoni tal-bajd u l-vitellogenina;
- Riżultati tal-analiżi tad-dejta, idealment f'forma tabulari u grafika;
- Inċidenza ta' kwalunkwe reazzjoni mhux tas-soltu mill-ħut u kwalunkwe effett viżibbli kkawżat mis-sustanza kimika tat-test

▼M7

GWIDA GHALL-INTERPRETAZZJONI U L-AĊĊETTAZZJONI TAR-RIŻULTATI TAT-TEST

51. Din is-sezzjoni fiha ftit kunsiderazzjonijiet li għandhom jitqiesu fl-interpretazzjoni tar-riżultati tat-test għad-diversi punti ta' tmiem imkejla. Ir-riżultati għandhom jiġu interpretati b'kawtela fejn is-sustanza kimika tat-test tidher li tkun qed tikkawża tossiċità evidenti jew li qed ikollha impatt fuq il-kundizzjoni ġenerali tal-annimal tat-test.
52. Meta tkun qed tiġi stabbilita l-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, għandha tingħata attenzjoni biex ma tinqabizx il-konċentrazzjoni massima tollerata biex tkun tista' ssir interpretazzjoni valida tad-dejta. Importanti li tal-anqas ikun hemm trattament wiehed li fih ma jkunx hemm sinjali ta' effetti tossiċi. Sinjali ta' mard u sinjali ta' effetti tossiċi għandhom jiġu vvalutati u rrapportati f'certu dettall. Pereżempju, huwa possibbli li l-produzzjoni tal-VTG fin-nisa tiġi affettwata wkoll mit-tossiċità ġenerali u modi ta' azzjoni tossiċi mhux endokrinali, eż. epatotossiċità. Madankollu, l-interpretazzjoni tal-effetti tista' tiġi sostnuta minn livelli ohra ta' kura li ma jiffixklux mit-tossiċità sistemika.
53. Hemm xi aspetti li wiehed irid iqis għall-aċċettazzjoni tar-riżultati tat-test. Bħala gwida, il-livelli tal-VTG fi gruppi ta' kontroll tal-irġiel u tan-nisa għandhom ikunu distinti u separati b'madwar tliet ordnijiet ta' kobor fil-karjun buras u fiż-żebra, u b'madwar ordni uniku ta' kobor għall-medaka. Eżempji tal-medda ta' valuri li wiehed jista' jiltaqa' magħhom fil-gruppi ta' kontroll u ta' kura huma disponibbli fir-rapporti ta' validazzjoni (1, 2, 3, 4). Valuri għolja tal-VTG fl-irġiel ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-rispons tal-assaġġ u l-kapaċità tiegħu li jiskopri agonisti dghajfa tal-estroġenu. Valuri baxxi tal-VTG fin-nisa ta' kontroll jistgħu jikkompromettu r-risponsività tal-assaġġ u l-hila tiegħu li jiskopri inibituri tal-aromatazi u antagonisti tal-estroġenu. Biex tinbena dik il-gwida ntużaw l-istudji ta' validazzjoni.
54. F'dak li għandu x'jaqsam mal-kwantifikazzjoni tal-produzzjoni tal-bajd, dan huwa soġġett għal varjazzjonijiet importanti [il-koeffiċjent tal-varjazzjoni (CV) jista' jvarja minn 20 sa 60 %] li jaffettwaw il-kapaċità tal-assaġġ li jidentifika tnaqqis sinifikanti fil-produzzjoni tal-bajd iżgħar minn 70 %, hekk kif is-CV javvicina 50 % jew aktar. Meta s-CV ikun limitat għal valuri aktar baxxi (madwar 20-30 %), l-assaġġ ikollu qawwa aċċettabbli (80 %) sabiex jidentifika tnaqqis ta' 40-50 % fil-produzzjoni tal-bajd. Id-disinn tat-test użat għall-karjun buras, inkluzi erba' repliki għal kull livell tat-trattament, għandu jippermetti aktar qawwa lill-punt tat-tmiem tal-fekondità, imqabbel ma' disinn tat-test b'2 repliki biss.
55. Jekk laboratorju ma jkunx għamel l-assaġġ qabel jew jekk ikunu saru bidliet sostanzjali (eż. bidla fir-razza tal-hut jew tal-fornitur) huwa rrakkomandat li jsir studju tal-profiċjenza teknika. Huwa rrakkomandat li jintużaw sustanzi kimiċi li jkopru firxa ta' modi ta' azzjoni jew impatti fuq għadd tal-punti ta' tmiem tat-test. Fil-prattika, kull laboratorju huwa mhegġegħ jibni dejta storika ta' kontroll proprja għall-irġiel u għan-nisa u biex jagħmel kimika ta' kontroll pozittiv għall-attività estroġenika (eż. 17 β -estradiol f'doża ta' 100 ng/l, jew agonist dghajjef magħruf) li twassal għal zieda fil-VTG fil-hut maskili, kimika ta' kontroll pozittiv għall-inibizzjoni tal-aromatazi (eż. fadrozole jew prochloraz f'doża ta' 300 μ g/l) li twassal għal tnaqqis fil-VTG fil-hut nisa, u kimika ta' kontroll pozittiv għall-attività androġenika (eż. 17 β -trenbolon f'doża ta' 5 μ g/l) li twassal għall-induzzjoni ta' karatteristiċi sesswali sekondarji fil-karjun buras u l-medaka femminili. Din id-dejta kollha tista' titqabbel ma' dejta disponibbli mill-istudji ta' validazzjoni (1, 2, 3) biex tiġi żgurata l-profiċjenza tal-laboratorju.
56. B'mod ġenerali, il-kejl tal-vitellogenina għandu jitqies pozittiv jekk ikun hemm zieda statistikament sinifikanti fil-VTG fl-irġiel ($p < 0,05$), jew tnaqqis statistikament sinifikanti fin-nisa ($p < 0,05$) tal-anqas fl-oghla doża ttestjata meta mqabbla mal-grupp ta' kontroll, u fin-nuqqas ta' sinjali ta' tossiċità ġenerali. Riżultat pozittiv jikseb sostenn ikbar meta jintwera li hemm relazzjoni bijoloġikament plawżibbli bejn id-doża u l-kurva tar-rispons. Kif intqal

▼ **M7**

qabel, it-tnaqqis fil-vitellogenina jaf ma jkollux origini kompletament endok-rinali; madankollu, ġeneralment riżultat pożittiv għandu jiġi interpretat bħala evidenza ta' attività endokrinali *in vivo*, u normalment għandu jagħti bidu għal azzjonijiet għal kjarifika ulterjuri.

57. Tista' tkun mehtieġa evalwazzjoni tal-istopatoloġija gonadali mill-awtoritajiet regolatorji sabiex tiġi ddeterminata l-idoneità riproduttiva tal-annimali tat-test u sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni tal-piż tal-evidenza tar-riżultati tat-test. L-eżekuzzjoni ta' istopatoloġija gonadali tista' ma tkunx mehtieġa f'każijiet fejn il-VTG jew il-karatteristiċi sesswali sekondarji jkunu pożittivi (jiġifieri żieda jew tnaqqis fil-VTG jew induzzjoni tal-karatteristiċi sesswali sekondarji).

TAGHRIF

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.
- (7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

- (11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinyloestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
- (21) Seki M., *et al.* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.
- (23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
- (24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76; pp.69-92.
- (25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.

▼ M7

- (26) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
- (27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (28) OECD (2006c), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
- (29) US EPA (2008), *Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay*, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.
- (30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼ **M7***Appendiċi 1*

ABBREVIJAZZJONIJIET U DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: sustanza jew tahlita

CV: koeffiċjent tal-varjazzjoni

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiċu

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali

Rata ta' tagħbija: il-piż imxarrab tal-hut skont il-volum ta' ilma.

MTC: Konċentrazzjoni Massima Tollerata, li tirrappreżenta madwar 10 % tal-LC₅₀

Densità tal-istokkjar: l-ġhadd ta' ħut għal kull volum ta' ilma.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita li tkun qed tiġi ttestjata permezz ta' dan il-metodu ta' ttestjar.

VTG: vitellogenina hija prekursor tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment isehh f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

▼M7

Appendiċi 2

KUNDIZZJONIJET SPERIMENTALI GHALL-ASSAĠĠ TAL-ISKRINJAR TAS-SISTEMA ENDOKRINALI TAL-HUT

1. Speċijiet rakkomandati	Karpjun buras (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Żebra (<i>Danio rerio</i>)
2. Tip ta' test	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu	Bi fluss kontinwu
3. Temperatura tal-ilma	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Kwalità tal-illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa')
5. Intensità tad-dawl	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjentali)
6. Fotoperjodu (it-tranzizzjonijiet bejn tluġh ix-xemx / inżul ix-xemx huma fakultattivi, mada-nakollu ma jittqisux neċessarji)	16-il siegħa ta' dawl, 8 sigħat ta' dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat ta' dlam	12-16-il siegħa ta' dawl, 12-8 sigħat ta' dlam
7. Rata ta' tagħbija	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l	< 5 g għal kull l
8. Id-daqs tal-kompartiment tal-ittestjar	10 l (minimu)	2 l (minimu)	5 l (minimu)
9. Volum tas-soluzzjoni tat-test	8 l (minimu)	1,5 l (minimu)	4 l (minimu)
10. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test	Minimu ta' 6 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum	Minimu ta' 5 kuljum
11. L-età tal-organizmi tat-test	Ara l-paragrafu 21	Ara l-paragrafu 21	Ara l-paragrafu 21
12. Piż imxarrab approssimattiv tal-hut adulti (g)	Nisa: 1,5 ± 20 % Irġiel: 2,5 ± 20 %	Nisa: 0,35 ± 20 % Irġiel: 0,35 ± 20 %	Nisa: 0,65 ± 20 % Irġiel: 0,4 ± 20 %
13. Nru ta' hut f'kull reċipjent tat-test	6 (2 irġiel u 4 nisa)	6 (3 irġiel u 3 nisa)	10 (5 irġiel u 5 nisa)
14. Nru. ta' trattamenti	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)	= 3 (flimkien mal-kontrolli xierqa)
15. Nru ta' reċipjenti għal kull trattament	Minimu ta' 4	Minimu ta' 4	Minimu ta' 2
16. Nru. ta' hut għal kull konċentrazzjoni tat-test	16-il mara adulta u 8 irġiel (4 nisa u 2 irġiel f'kull reċipjent irreplikati)	12-il mara adulta u 12 irġiel (3 nisa u 3 irġiel f'kull reċipjent irreplikati)	10-il mara adulta u 10 irġiel (5 nisa u 5 irġiel f'kull reċipjent irreplikati)
17. Reġim ta' tmigh	Gambli adulti jew nauplii tal-ilma mielah hajjin jew iffrizati darbtejn jew tliet darbiet kuljum (<i>ad libitum</i>), ikel disponibbli fis-suq jew tahlita ta' dawn ta' hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielah darbtejn jew tliet darbiet kuljum (<i>ad libitum</i>), ikel disponibbli fis-suq jew tahlita ta' dawn ta' hawn fuq	Gambli nauplii tal-ilma mielah darbtejn jew tliet darbiet kuljum (<i>ad libitum</i>), ikel disponibbli fis-suq jew tahlita ta' dawn ta' hawn fuq

▼ M7

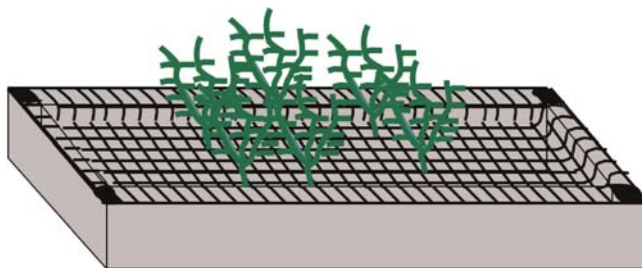
18. Ossigenazzjoni	Xejn hlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taht is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn hlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taht is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja	Xejn hlief jekk il-konċentrazzjoni tad-DO taqa' taht is-60 % tas-saturazzjoni tal-arja
19. Ilma tad-dilwizzjoni	Ilma tal-wieċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wieċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif	Ilma tal-wieċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorinat nadif
20. Perjodu ta' pre-espożizzjoni	perjodu rakkomandat ta' 7-14-il jum	perjodu rakkomandat ta' 7-14-il jum	perjodu rakkomandat ta' 7-14-il jum
21. Id-durata tal-esponiment kimiku	21 jum	21 jum	21 jum
22. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	— sopravivenza — imġiba — fekondità — karatteristiċi sesswali sekondarji — VTG — istopatoloġija gonadali b'mod fakultattiv	— sopravivenza — imġiba — fekondità — karatteristiċi sesswali sekondarji — VTG — istopatoloġija gonadali b'mod fakultattiv	— sopravivenza — imġiba — fekondità — VTG — istopatoloġija gonadali b'mod fakultattiv
23. Aċċettabilità tat-test	Ossigenu dissolt ≥ 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 25 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-hut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi hdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossigenu dissolt ≥ 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 25 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-hut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi hdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.	Ossigenu dissolt ≥ 60 % tas-saturazzjoni; temperatura medja ta' 26 ± 2 °C; sopravivenza ta' 90 % tal-hut fil-kontrolli; konċentrazzjonijiet imkejla tat-test fi hdan 20 % tal-valuri medji mkejla għal kull livell ta' trattament.

▼ **M7***Appendiċi 3***XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI
AĊĊETTABBLI**

KOMPONENT	KONĊENTRAZZJONIJIET
Materja partikolata	< 20mg/l
Karbonju organiku totali	< 2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	< 1 µg/l
Kloru residwu	< 10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	< 50 ng/l
Pestiċidi organofosforiċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati	< 50 ng/l
Kloru organiku totali	< 25 ng/l

▼ **M7***Appendiċi 4A***SOTTOSTRAT TAL-BIDIEN GHAŻ-ŻEBRA**

Trej għall-bidien: dixx kollu tal-ħġieġ, pereżempju $22 \times 15 \times 5,5$ cm (l x w x d), kopert b'kannizzata tal-azzar inossidabbli li tista' titneħħa (xibka wiesgħa 2mm). Il-kannizzata għandha tghatti l-bokka tad-dixx f'livell taħt ix-xifer.



Is-sottostrat tal-bidien għandu jitpoġġa fuq il-kannizzata. Għandu jipprovdi struttura biex il-hut ikunu jistgħu jidhlu fiha. Pereżempju, pjanti artifiċjali tal-akkwarji magħmulin minn materjal aħdar tal-plastik huma tajbin (NB: għandu jitqies l-adsorbiment possibbli tal-kimika tat-test fil-materjal tal-plastik). Il-materjal tal-plastik għandu jitbattal f'volum suffiċjenti ta' ilma shun għal tul ta' żmien suffiċjenti biex jiġi żgurat li ma tintreha ebda sustanza kimika fl-ilma tat-test. Meta jkun qed jintuża materjal tal-ħġieġ għandu jiġi żgurat li l-hut la jindarab u lanqas ma jkun iġfult matul l-azzjonijiet vigorużi tiegħu.

Id-distanza bejn it-trej u l-panewwi tal-ħġieġ għandha tkun ta' mill-inqas 3 cm biex jiġi żgurat li l-bidien ma jsirx barra mit-trej. Il-bajd li jitbied fuq it-trej jaqa' minn ġol-kannizzata u jista' jiġi kampjunat tliet kwarti sa siegħa wara l-bidu tal-illuminazzjoni. Il-bajd trasparenti ma jehilx u jista' jingħadd faċilment permezz tal-użu ta' dawli transversali. Meta jkun qed jintużaw hames nisa f'kull reċipjent, sa 20 bajda f'għurnata jistgħu jitqiesu bħala kwantità baxxa, sa 100 bħala medja u aktar minn 100 bħala kwantità għolja. It-trej tal-bidien għandu jitneħħa, il-bajd għandu jingabar u t-trej tal-bidien għandu jerga' jiddaħhal fir-reċipjent tat-test, jew l-aktar tard possibbli filgħaxija jew kmieni hafna filgħodu. It-trej tal-bidien m'għandux jithalla aktar minn siegħa biex jerga' jiddaħhal peress li nkella s-sinjal tas-sottostrat tal-bidien jista' jinduċi tghammir individwali u bidien fi żmien mhux tas-soltu. Jekk sitwazzjoni tkun teħtieġ li t-trej tal-bidien jiddaħhal aktar tard, dan għandu jsir mill-inqas 9 sigħat wara l-bidu tal-illuminazzjoni. F'dan il-hin tard fil-għurnata, il-bidien ma jibqax jiġi indott iktar. 7Appendiċi 4B

▼ **M7***Appendiċi 4 B***SOTTOSTRAT TAL-BIDIEN GHALL-KARPJUN BURAS**

F'kull kompartiment tat-test jitqiegħdu żewġ jew tliet madumiet jew trejs riproduttivi kkombinati tal-plastik/ċeramika/hġieġ jew tal-azzar inossidabbli (eż. kanal semiċirkulari griż twil 80mm imqiegħed fuq trej bix-xoffa twil 130mm) (ara l-istampa). Intwera li madum taċ-ċeramika jew tal-PVC akklimatizzati sew joqgħod bħala sottostrat tal-bidien (Thorpe *et al*, 2007).

Huwa rrakkomandat li l-madum jinbarax biex tittejjeb l-adeżjoni. It-trej għandu jigi skrinjat ukoll biex il-hut jitwaqqaf milli jaċċessa l-bajd li jkun waqa' sakemm ma tkunx intweriet effiċjenza tas-sottostrat tal-bidien użat fl-adeżjoni tal-bajd.



Il-bażi hija ddisinjata biex iżzomm kwalunkwe bajd li ma jehilx mal-wiċċ tal-madum u għalhekk jaqa' f'qiegħ it-tank (jew dak il-bajd li jitbied direttament fuq il-bażi ċatta tal-plastik). Qabel jintużaw, is-sottostrati tal-bidien għandhom jitbattlu lkoll għal mhux inqas minn 12-il siegħa, filma tad-dilwizzjoni.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

▼ M7

Appendiċi 5 A

**VALUTAZZJONI TAL-KARATTERISTIĊI SESSWALI SEKONDARJI
FIL-KARPJUN BURAS GHAD-DETEZZJONI TA' ĊERTI SUSTANZI
KIMIĊI ATTIVI FIS-SISTEMA ENDOKRINALI**

Harsa ġenerali

Karatteristiċi potenzjalment importanti fid-dehra fiżika fil-karpjuni buras adulti fl-ittestjar għal sustanzi li jfixxlu s-sistema endokrinali jinkludu l-kulur tal-ġisem (jiġifieri ċar/skur), il-mudelli ta' kolorazzjoni (jiġifieri l-preżenza jew in-nuqqas ta' faxex vertikali), il-forma tal-ġisem (jiġifieri l-forma tar-ras u tar-reġjun pettorali, id-distensjoni tal-addome), u l-karatteristiċi sesswali sekondarji speċjalizzati (jiġifieri l-ghadd u d-daqs tat-tuberkuli tan-namra, id-daqs tal-kuxxinett dorsali u tal-ovipożitur).

It-tuberkuli tan-namra jinsabu fuq ir-ras (il-kuxxinett dorsali) tal-karpjuni buras irġiel riproduttivament-attivi, u ġeneralment ikunu rrangati f'mudell bilaterament simmetriku (Jensen *et al.* 2001). In-nisa tal-kontroll u l-irġiel u n-nisa żgħar ma juru l-ebda żvilupp ta' tuberkuli (Jensen *et al.* 2001). Jista' jkun hemm sa tmien tuberkuli individwali madwar l-ghajnejn u bejn l-imnifsejn tal-irġiel. L-akbar ghadd ta' tuberkuli u l-akbar tuberkuli jinsabu f'zewġ linji paralleli eżatt taht l-imnieher u fuq il-halq. F'hafna hut hemm gruppi ta' tuberkuli taht ix-xedaq t'isfel; daww l-eqreb tal-halq ġeneralment jinsabu bhala par uniku, filwaqt li l-aktar sett ventrali jista' jkun magħmul minn massimu ta' erba' tuberkuli. L-ghadd attwali ta' tuberkuli rarament ikun ta' aktar minn 30 (medda, 18-28; Jensen *et al.* 2001). It-tuberkuli predominanti (f'termini ta' ghadd) huma preżenti bhala struttura wahda, relattivament tonda, b'għoli kważi ekwivalenti għar-raġġ. Hafna mill-irġiel attivi fir-riproduzzjoni għandhom ukoll, tal-anqas ftit, tuberkuli mkabbrin u evidenti li m'humiex distingwibbli bhala strutturi individwali.

Xi tipi ta' sustanzi kimiċi li jfixxlu s-sistema endokrinali jistgħu jikkawżaw l-okkorrenza anormali ta' ċerti karatteristiċi sesswali sekondarji fis-sess oppost; pereżempju, agonisti tar-riċettur tal-androġenu, bħal 17 α -metilttestosteron jew 17 β -trenbolon, jistgħu jikkawżaw l-iżvilupp ta' tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras nisa (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), filwaqt li agonisti tar-riċettur tal-estroġenu jistgħu jnaqqsu l-ghadd jew id-daqs tat-tuberkuli tan-namra fl-irġiel (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

Hawn taht hawn deskrizzjoni tal-karatterizzazzjoni tat-tuberkuli tan-namra fil-karpjuni buras fuq il-bażi ta' proċeduri użati fil-laboratorju tal-Aġenzija għall-Harsien tal-Ambjent f'Duluth, MN, l-Istati Uniti. Prodotti u/jew tagħmir speċifiċi jistgħu jiġu sostitwiti ma' materjali paragonabbli disponibbli.

L-osservazzjoni ssir l-ahjar bl-użu ta' lenti illuminata jew mikroskopju 3X illuminat għad-dissezzjonijiet. Hares lejn il-huta mil-lat dorsali u anterjuri 'l quddiem (ir-ras lejn min ikun qed josserva).

— Poġġi l-huta f'dixx Petri zġħir (eż. b'dijametru ta' 100 mm), anterjuri 'l quddiem, u ventrali 'l isfel. Iffoka l-viewfinder biex tippermetti l-identifikazzjoni tat-tuberkuli. Bil-galbu u bil-mod dawwar il-huta minn naha għall-oħra biex tidentifika ż-żoni fejn ikun hemm it-tuberkuli. Ghodd u kklassifika t-tuberkuli.

— Irripeti l-osservazzjoni fuq il-lat ventrali tar-ras billi tpoġġi l-lat anterjuri dorsali tal-huta 'l quddiem fid-dixx Petri.

— L-osservazzjonijiet għandhom jitlestew fi żmien 2 minuti għal kull huta.

▼ **M7****L-Ghadd u l-Klassifikazzjoni tat-Tuberkuli**

Ġew identifikati sitt zoni speċifiċi għall-valutazzjoni tal-preżenza u tal-iżvilupp tat-tuberkuli f'karpjuni buras adulti. Ġie żviluppat mudell biex jiġu mmappjati l-post u l-kwantità tat-tuberkuli preżenti (ara fl-aħħar ta' dan l-Appendiċi). L-għadd ta' tuberkuli jiġi rreġistrat u d-daqs tagħhom jista' jiġi kklassifikat b'mod kwantitattiv bħala: 0- xejn, 1-preżenti, 2-imkabbrin u 3-evidenti għal kull organizzmu (Fig. 1).

Klassifikazzjoni ta' 0- ebda tuberkulu preżenti. Klassifikazzjoni ta' 1-preżenti, hija identifikata bħala kwalunkwe tuberkulu li jkollu punt uniku li l-gholi tiegħu ikun kwazi ekwivalenti għar-raġġ tiegħu. Klassifikazzjoni ta' 2-mkabbrin, hija identifikata bħala tessut li fid-dehra jixbah asterisk, li ġeneralment ikollu bażi radjali kbira bi xquq jew kanali herġin miċ-ċentru. Hafna drabi l-gholi tat-tuberkuli ikun aktar ippizzjat iżda xi drabi jista' jkun naqra fit-tond. Klassifikazzjoni ta' 3-evidenti, ġeneralment ikun pjuttost kbir u ttundjat bi struttura inqas definita. Xi drabi dawn it-tuberkuli ikunu qrib xulxin u jiffurmaw massa wahda tul zona individwali jew tahlita ta' zoni (B, C u D, deskritti hawn taħt). Il-kolorazzjoni u d-disinn huma simili għall-klassifikazzjoni ta' 2 iżda xi drabi ikunu pjuttost indiskriminati. Ġeneralment, l-użu ta' din is-sistema ta' klassifikazzjoni jwassal għal punteġġi globali ta' tuberkuli ta' < 50 fraġel normali tal-kontroll b'għadd ta' 18 sa 20 tuberkulu (Jensen *et al.* 2001).

Figura 1

F'ċertu hut, l-għadd proprju ta' tuberkuli jista' jkun akbar mill-kaxxi tal-mudelli għal zona partikolari ta' klassifikazzjoni. F'dan il-każ, in-numri addizzjonali ta' klassifikazzjoni jistgħu jiġu mmarkati ġewwa, fuq il-lemin jew fuq ix-xellug tal-kaxxa. Għalhekk, il-mudell ma għandux bżonn juri simmetrija. Teknika addizzjonali għall-immappjar tat-tuberkuli f'pari jew mehmuzin vertikament tul il-pjan orizzontali tal-halq tista' ssir billi f'kaxxa wahda jitniżżlu żewġ punti ta' klassifikazzjoni tat-tuberkuli.

Reġjuni ta' mmappjar:

A - Tuberkuli li jinsabu madwar l-ghajnejn. Jiġu mmappjati mil-lat dorsali għal dak ventrali madwar ir-rimm anterjuri tal-ghajn. Komunement dawn ikunu f'multipli firġiel maturi ta' kontroll, ma jkunux preżenti f'nisa ta' kontroll, ikunu ġeneralment f'par (wiehed hdejn kull għajn) jew wahedhom f'nisa esposti għall-androġeni.

B - Tuberkuli li jinsabu bejn l-immieher, (pori sensorjali fil-kanal). Normalment dawn ikunu f'pari firġiel tal-kontroll f'livelli aktar elevati (2- imkabbrin jew 3-evidenti) ta' żvilupp. Mhux preżenti f'nisa tal-kontroll b'xi okkorrenza u żvilupp f'nisa esposti għall-androġeni.

C - Tuberkuli li jinsabu eżatt wara l-immieher, paralleli mal-halq. Ġeneralment dawn ikunu mkabbrin jew evidenti firġiel maturi tal-kontroll. Preżenti jew imkabbrin firġiel anqas żviluppati jew f'nisa ttrattati bl-androġeni.

▼ **M7**

D - Tuberkuli li jinsabu paralleli tul il-linja tal-halq. Ġeneralment ikklassifikatati bħala żviluppati firġiel tal-kontroll. Assenti f'nisa tal-kontroll iżda preżenti f'nisa esposti għall-androġeni.

E - Tuberkuli li jinsabu fuq ix-xedaq t'isfel, qrib il-halq, normalment ikunu żgħar u ġeneralment ikunu f'pari. Ivarjaw firġiel tal-kontroll jew ittrattati, u f'nisa ttrattati.

F - Tuberkuli li jinsabu fil-lat ventrali għal E. Normalment ikunu żgħar u f'pari. Preżenti firġiel tal-kontroll u f'nisa esposti għall-androġeni.

REFERENZI

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Mudell għat-Tuberkuli:

ID _____

Data _____

Punteġġ Totali _____

Klassifikazzjoni Numerika

1-preżenti

2-imkabbar

3-pronunzjat

	A	X1	X1	X1	X1

	B	X1	X1	X1	X1

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1

▼ M7

Appendiċi 5 B

**VALUTAZZJONI TAL-KARATTERISTIĊI SESSWALI SEKONDARJI
FIL-MEDAKA GHAD-DETEZZJONI TA' ĊERTI SUSTANZI KIMIĊI
ATTIVI FIS-SISTEMA ENDOKRINALI**

Hawn taht tinghata deskrizzjoni tal-kejl tal-proċessi papillari ⁽¹⁾, li huma l-karatteristiċi sesswali sekondarji fil-medaka (*Oryzias latipes*).

- (1) Wara l-qtugħ tal-fwied (Appendiċi 6), il-karkassa titqiegħed f'tubu koniku li jkun fih madwar 10 ml ta' 10 % formalina newtrali bbaferjata ('il fuq: ir-ras, 'l isfel: id-denb). Jekk il-gonada titqiegħed f'soluzzjoni oħra li mhijiex 10 % formalina newtrali bbaferjata, aghmel qatgħa trasversali tul il-karkassa bejn ir-regjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus permezz ta' xafra, u ara li ma tagħmilx ħsara lill-gonopori u l-gonada stess (Fig.3). Poġġi n-naħa kranjali tal-ġisem tal-huta fis-soluzzjoni fissattiva biex tippreserva l-gonada, u n-naħa tad-denb tal-ġisem tal-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata kif deskritta hawn fuq.
- (2) Wara li tpoġġi l-ġisem tal-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata, aqbad ir-regjun anterjuri tal-pinna anali b'pinzetta u itwih għal madwar 30 sekonda biex iżomm il-pinna anali miftuħa. Meta tkun qed taqbad il-pinna anali b'pinzetta, aqbad f'it xewk tal-pinen fir-regjun anterjuri bil-galbu biex ma tobroxx il-proċessi papillari.
- (3) Wara li żżomm il-pinna anali miftuħa għal madwar 30 sekonda, aħżen ġisem il-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata f'temperatura ambjentali sakemm jitkejl il-proċessi papillari (il-kejl għandu jsir wara f'fissar għal mhux anqas minn 24 siegħa).

Kejl

- (1) Wara l-iffissar tal-ġisem tal-huta f'10 % formalina newtrali bbaferjata għal mill-inqas 24 siegħa, iġbor il-karkassa tal-huta mit-tubu koniku u imsah il-formalina fuq il-karta tal-filtru (jew b'xugaman tal-karta).
- (2) Poġġi l-hut bl-addome 'l fuq. Imbagħad aqta' l-pinna anali b'imqass żgħir tad-dissezzjoni bil-galbu (idealment għandek taqta' l-pinna anali b'ammont żgħir ta' pterigjofora).
- (3) Aqbad ir-regjun anterjuri tal-pinna anali li tkun inqatgħet b'pinzetta u poġġiha fuq lastra tal-ħġieġ b'diversi qtar tal-ilma. Imbagħad aghthi l-pinna anali b'għatu tal-ħġieġ. Ara li meta tkun qed taqbad il-pinna anali bil-pinzetta ma tobroxx il-proċessi papillari.
- (4) Ghodd in-numru tal-joint plate bi proċessi papillari permezz ta' kontatur taħt mikroskopju bijoloġiku (mikroskopju wieqaf jew mikroskopju invertit). Il-proċessi papillari jingħarfu meta jkun hemm formazzjoni żgħira ta' proċessi vizibbli fuq in-naħa posterjuri tal-joint plate. Ikteb in-numru tal-patt magħqud

⁽¹⁾ Normalment il-proċessi papillari jidhru biss f'irġiel adulti u jinsabu fuq ix-xewk tal-pinen mit-tieni sas-seba' jew it-tmien waħda jekk wiehed jghodd min-naħa posterjuri tal-pinna anali (Fig.1 u 2). Madankollu, il-proċessi rarament jidhru fl-ewwel xewka tal-pinna mill-lat posterjuri tal-pinna anali. Dan l-SOP ikopri l-kejl ta' proċessi fuq l-ewwel xewka tal-pinna (l-ghadd ta' xewk tal-pinen jirreferi għall-ordni min-naħa posterjuri tal-pinna anali f'dan l-SOP).

▼ **M7**

li jkollu proċessi papillari f'kull xewka tal-pinna fuq il-worksheet (eż. l-ewwel xewka tal-pinna: 0, it-tieni xewka tal-pinna: 10, it-tielet xewka tal-pinna: 12, eċċ.) u dahhal it-total ta' dan in-numru fuq l-spreadsheet tal-Excel għal kull huta individwali. Jekk ikun hemm bżonn, hu ritratt tal-pinna anali u għodd in-numru tal-joint plate bi proċessi papillari fuq ir-ritratt.

(5) Wara l-kejl, poġġi l-pinna anali fit-tubu koniku deskritt f'(1) u aħznu.

Fig.1.

Dijagramma li turi differenza sesswali fil-forma u d-daqs tal-pinna anali. A, raġel; B, mara. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

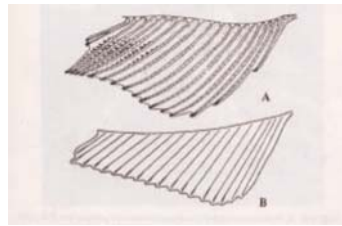


Fig.2.

A, Proċessi fuq joint plates ta' xewka tal-pinna anali. J.P., joint plate; A.S., spazju assjali; P., proċess. B, Estremità distali tax-xewka tal-pinna. L-Aktinotrikiji (Act.) qeghdin fuq il-ponta. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

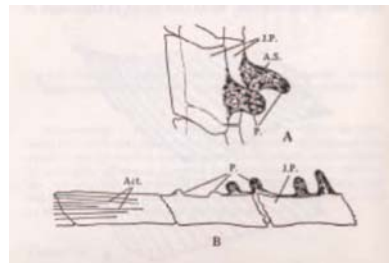
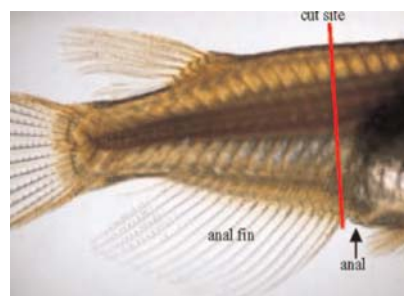


Fig.3.

Ritratt tal-ġisem ta' huta li juri l-post tal-qtugħ meta l-gonada tkun iffissata fis-soluzzjoni fissattiva li mhijiex 10 % formalina newtrali bbaferjata. F'dak il-każ, il-ġisem li jifdal jinqata' bejn ir-reġjun anterjuri tal-pinna anali u l-anus b'xafra (strixxa hamra), u l-parti tar-ras tal-ġisem tal-huta titqiegħed fis-soluzzjoni fissattiva għall-gonada u l-parti tad-denb ta' ġisem il-huta titqiegħed f'10 % formalina newtrali bbaferjata.



▼ **M7***Appendiċi 6***PROĊEDURI RAKKOMANDATI GHALL-ĠBIR TAL-KAMPJUNI GHALL-ANALIŻI TAL-VITELLOĠENINA**

Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata bejn il-kampjuni tal-VTG tal-irġiel u tan-nisa.

Proċedura 1 A: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina/Arterja Kawdali

Wara li tingħata l-anestezija, il-pedunkulu kawdali jinqata' parzjalment b'xafra tal-iskarpell u d-demm jingabar mill-vina/arterja kawdali b'tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Wara li jingabar id-demm, il-plażma tiġi izolata malajr permezz ta' ċentrifugazzjoni għal 3 min f'15 000 g (jew inkella għal 10 min. f'15 000 g f'temperatura ta' 4 °C). Jekk ikun mixtieq, il-perċentwal tal-ematokrit jista' jiġi ddeterminat wara ċ-ċentrifugazzjoni. Imbagħad il-porzjon tal-plażma jitneħħa mit-tubu mikroematokritiku u jinħażen go tubu ċentrifugu b'0,13-il unità ta' aprotinin (inibitur tal-proteazi) f'temperatura ta' – 80 °C sakemm tkun tista' ssir id-determinazzjoni tal-vitelloġenina. Skont id-daqs tal-karpjun buras (li jiddependi mis-sess), il-volumi tal-plażma li jistgħu jingabru generalment ivarjaw minn 5 sa 60 mikrolitru għal kull huta (Jensen *et al.* 2001).

Proċedura 1 B: Karpjun Buras, Il-Ġbir ta' Demm mill-Qalb

Inkella d-demm jista' jingabar ukoll permezz ta' titqiba fil-qalb b'siringa eparinizzata (1 000 unità eparina għal kull ml). Id-demm jiġi ttrasferit f'tubi Eppendorf (mizmuma fuq is-silġ) u mbagħad jiġi ċentrifugat (5 min, 7 000 g, f'temperatura ambjentali). Il-plażma għandha tiġi ttrasferita f'tubi Eppendorf nodfa (falikwoti jekk il-volum tal-plażma jippermetti li dan isir) u dlonk tiġi ffrizata f'temperatura ta' – 80 °C, sakemm tiġi analizzata (Panter *et al.*, 1998).

Proċedura 2 A: Medaka Ġappuniza, il-Qtugh tal-Fwied fil-Medaka

It-tneħħija tal-huta tat-test mill-kompartiment tat-test

- (1) Il-hut tat-test għandu jitneħħa mill-kompartiment tat-test permezz ta' xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa (spoon-net). Ara li ma twaqqax il-hut tat-test fil-kompartimenti l-oħra tat-test.
- (2) Fil-prinċipju, il-hut tat-test għandu jitneħħa fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-oġġla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv. Barra minn hekk, l-irġiel kollha għandhom jitneħħew minn kompartiment wiehed tat-test qabel ma jitneħħew in-nisa li jifdal.
- (3) Is-sess ta' kull huta tat-test jiġi identifikat abbażi tal-karatteristiċi sesswali sekondarji esterni (eż. il-forma tal-pinna anali).
- (4) Poġġi l-hut tat-test f'reċipjent għat-trasport u gorru lejn l-istazzjon tax-xogħol għall-qtugh tal-fwied. Iċċekkja t-tikketti tal-kompartiment tat-test u tar-reċipjent tat-trasport għall-eżattezza u biex tikkonferma li l-ghadd ta' hut li jkun tneħħa mill-kompartiment tat-test u li l-ghadd ta' hut li fadal fil-kompartiment tat-test huma konsistenti ma' dak li huwa mistenni.
- (5) Jekk is-sess ma jkunx jista' jiġi identifikat mid-dehra esterna tal-huta, neħhi l-hut kollu mill-kompartiment tat-test. F'dan il-każ, is-sess għandi jiġi identifikat billi jiġu osservati l-gonadi jew il-karatteristiċi sesswali sekondarji taħt mikroskopju sterjoskopiku.

Qtugh tal-fwied

- (1) Ittrasferixxi l-hut tat-test mir-reċipjent biex jiġi trasportat lejn is-soluzzjoni anestetika bix-xibka żgħira f'forma ta' mgħarfa.

▼ **M7**

- (2) Wara li l-hut tat-test ikun ġie anestetizzat, ittrasferixxi l-hut tat-test fuq karta fitru (jew biċċa tal-karti) b'pinzetta (tip bażiku). Meta tkun qed iżżomm il-hut tat-test, applika l-pinzetta fuq il-ġnub tar-ras biex tevita milli tikser id-denb.
- (3) Imsah l-ilma fuq wiċċ il-huta tat-test fuq il-karta fitru (jew il-biċċa tal-karti).
- (4) Pogġi l-hut bl-addome 'l fuq. Imbagħad aghmel inċiżjoni trazzversali żgħira bejn ir-reġjun ventrali tal-ghonq u r-reġjun addominali tan-nofs b'imqass tad-dissezzjoni.
- (5) Dahhal l-imqass tad-dissezzjoni fl-inċiżjoni ż-żgħira, u aghmel inċiżjoni fl-addome minn punt kawdali għall-branchial mantle għan-naha kranjali tal-anus tul il-linja tan-nofs tal-addome. Ara li ma dahhalx l-imqass tad-dissezzjoni wisq fil-fond biex tevita milli tagħmel hsara fil-fwied u l-gonadi.
- (6) Wettaq l-operazzjonijiet li ġejjin taht il-mikroskopju sterjoskopiku.
- (7) Pogġi l-hut tat-test bl-addome 'l fuq, fuq il-biċċa tal-karti (dixx Petri tal-ħġieġ jew lastri tal-ħġieġ huma disponibbli wkoll).
- (8) Estendi l-hitan tal-kavità addominali b'pinzetta ta' preċiżjoni u oħroġ l-organi interni fuq barra. Huwa aċċettabbli wkoll li toħroġ l-organi interni fuq barra billi tneħhi naha wahda tal-hajt tal-kavità addominali jekk ikun meħtieġ.
- (9) Esponi l-parti mqabbda tal-fwied u tal-marrara b'pinzetta oħra ta' preċiżjoni. Imbagħad aqbad il-kanal tal-bili u aqta' l-marrara barra. Ara li ma tiksirx il-marrara.
- (10) Aqbad l-esofagu u bl-istess mod aqta' l-passaġġ gastrointestinali minn mal-fwied. Ara li l-kontenut tal-passaġġ gastrointestinali ma jnixxix. Aqta' l-passaġġ gastrointestinali kawdali minn mal-anus u neħhi l-passaġġ mill-kavità addominali.
- (11) Ittrimmja l-massa ta' xaham u t-tessuti l-oħrajn mill-periferija tal-fwied. Ara li ma tobroxx il-fwied.
- (12) Aqbad iż-żona portali tal-fwied permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni u neħhi l-fwied mill-kavità addominali.
- (13) Pogġi l-fwied fuq il-lastra tal-ħġieġ. Permezz tal-pinzetta ta' preċiżjoni, neħhi kwalunkwe xaham addizzjonali u tessut estranju (eż. ir-rita addominali), jekk ikun meħtieġ, mill-wiċċ tal-fwied.
- (14) Kejjel il-piż tal-fwied b'mikrotubu ta' 1,5 ml bħala tara permezz ta' mizien analitiku elettroniku. Irreġistra l-valur fuq il-worksheet (jinqara: 0,1 mg). Ikkonferma l-informazzjoni ta' identifikazzjoni fuq it-tikketta tal-mikrotubu.
- (15) Aghlaq l-għatu tal-mikrotubu li fih il-fwied. Żommu mahżun fi xtilliera għat-tkessih (jew fi xtilliera tas-silġ).
- (16) Wara l-qtugħ ta' fwied wiehed, naddaf l-istrumenti tad-dissezzjoni jew ibdilhom ma' oħrajn nodfa.

▼ **M7**

(17) Nehhi l-fwied mill-hut kollu fir-reċipjent tat-trasport kif deskritt hawn fuq.

(18) Wara l-qtugh tal-fwied mill-hut kollu fir-reċipjent tat-trasport (jiġifieri l-irġiel jew in-nisa kollha f'kompartiment tat-test), poġġi l-kampjuni kollha tal-fwied fi xtilliera għat-tubi b'tikketta għall-identifikazzjoni u aħzinha fil-friza. Meta l-fwied jinghata għal pretrattament f'it wara l-qtugh, il-kampjuni jittiehdu fl-istazzjon tax-xogħol li jmiss fi xtilliera għat-tkessih (jew fi xtilliera tas-silġ).

Wara l-qtugh tal-fwied, il-karkassa tal-huta tkun disponibbli għall-istoloġija gonadali u għall-kejl tal-karatteristiċi sesswali sekondarji.

Kampjun

Ahżen il-kampjuni tal-fwied li ttiehdu mill-hut tat-test f'temperatura ta' ≤ -70 °C jekk ma jintużawx għall-pretrattament f'it wara l-qtugh.

Fig-1

Issir qatgha eżatt wara l-pinen pettorali bi mqass.

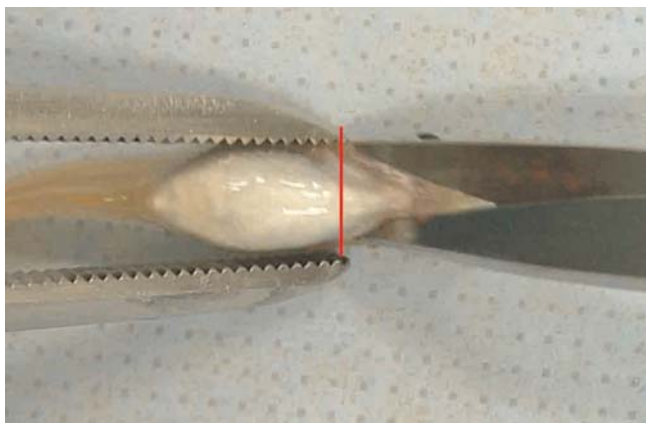


Fig-2

Inċiżjoni fil-linja tan-nofs tal-addome b'imqass sa punt madwar 2 mm kranjali għall-anu.



▼ **M7**

Fig-3

Il-hitant addominali jinferqu b'forċipi biex jiġi espost il-fwied u organi interni oħra.

(Inkella, il-hitant addominali jistghu jiġu ppinjati lateralment). Il-vleġġa turi l-fwied.

Il-vleġġa turi l-fwied.

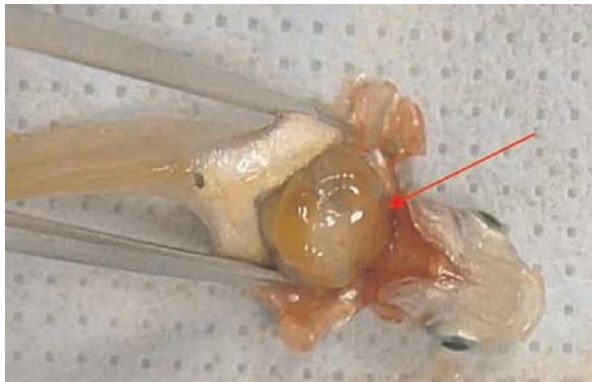


Fig-4

Il-fwied ġie dissezżjonat u jinqata' malajr bil-forċipi.

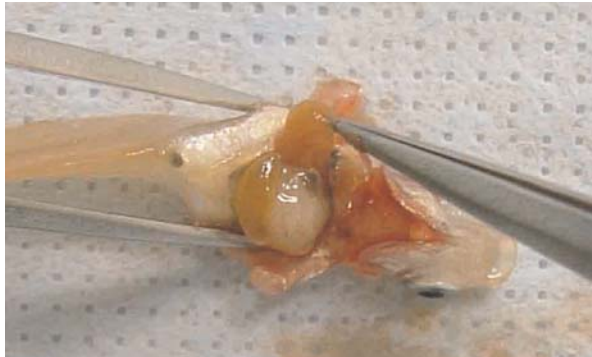
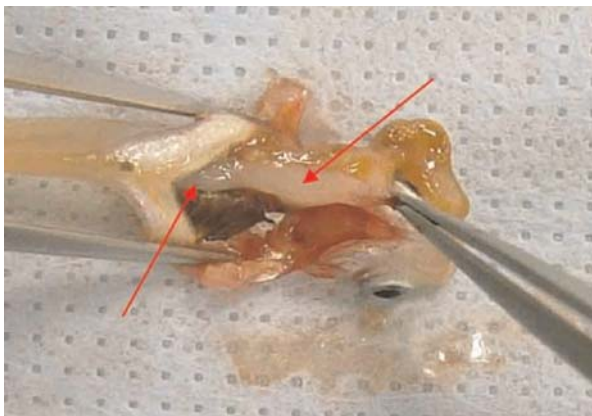


Fig-5

L-intestini jinharġu bil-galbu permezz tal-forċipi.



▼ M7

Fig-6

Iż-żewġ trufijiet tal-intestini u kwalunkwe Appendiċi meżenterika jinqatghu bl-imqass.

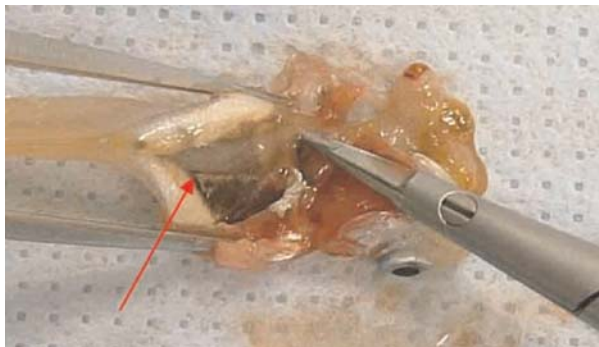


Fig-7 (mara)

Il-proċedura hija identika għall-mara.

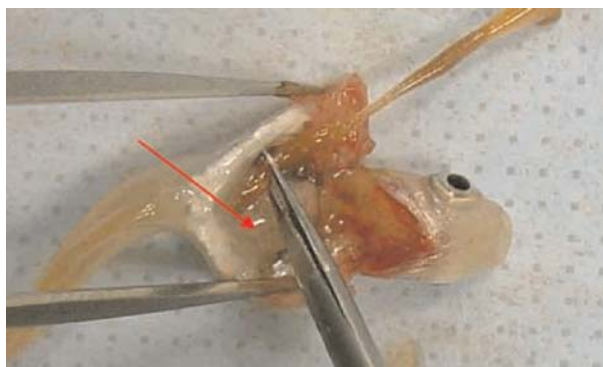


Fig-8

Il-proċedura lesta.



▼ **M7****Proċedura 2 B: Medaka Ġappuniża (*Oryzias latipes*), Pretrattament tal-Fwied għall-Analiżi tal-Vitellogenina**

Hu l-flixxun tal-bafer omoġenat mill-kitt ELISA u kesshu b'silġ imfarrak (temperatura tas-soluzzjoni: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Jekk ikun qed jintuża bafer omoġenat mis-sistema EnBio ELISA, halli s-soluzzjoni toqghod f'temperatura tal-kamra, u mbagħad kessah il-flixxun bis-silġ imfarrak.

Ikkalkola l-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied fuq il-bażi tal-piż tiegħu (żid 50 μl ta' bafer omoġenat għal kull mg tal-piż tal-fwied). Pereżempju, jekk il-piż tal-fwied ikun ta' 4,5 mg, il-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied ikun ta' 225 μl . Hejji lista tal-volum tal-bafer omoġenat għall-fwied kollu.

Thejija tal-fwied għal pretrattament

- (1) Ohroġ il-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied mill-friza eżatt qabel it-trattament minn qabel.
- (2) Il-pretrattament tal-fwied mill-irġiel għandu jsir qabel dak tan-nisa biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-vitellogenina. Barra minn hekk, il-pretrattament għall-gruppi tat-test għandu jsir fl-ordni li ġejja: il-kontroll, il-kontroll tas-solvent (fejn xieraq), l-inqas konċentrazzjoni, il-konċentrazzjoni tan-nofs, l-ogħla konċentrazzjoni u l-kontroll pożittiv.
- (3) L-ghadd ta' mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom kampjuni tal-fwied meħudin mill-friza fi żmien partikolari m'għandux jaqbez l-ghadd li jista' jiġi ċentri-fugat dak il-hin.
- (4) Irranga l-mikrotubi ta' 1,5 ml li fihom il-kampjuni tal-fwied fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq ix-xtilliera tas-silġ (m'hemmx bżonn li l-fwied jinħall).

Operazzjoni tal-pretrattament

1) Żieda tal-bafer omoġenat

Iċċekkja l-lista għall-volum tal-bafer omoġenat li ser jintuża għal kampjun partikolari ta' fwied u aġġusta l-mikropipetta (medda tal-volum: 100-1 000 μl) sakemm jintlaħaq il-volum xieraq. Wahhal ponta nadifa mal-mikropipetta.

Hu l-bafer omoġenat mill-flixxun tar-reagent u zid il-bafer mal-mikrotubu ta' 1,5 ml li jkun fih il-fwied.

Żid il-bafer omoġenat fil-mikrotubi kollha ta' 1,5 ml li jkun fihom il-fwied skont il-proċedura deskritta hawn fuq. M'hemmx bżonn li tibdel il-ponta tal-mikropipetta ma' wahda ġdida. Madanakollu, jekk il-ponta tkun kontaminata jew ikun hemm sospett li tkun kontaminata, il-ponta għandha tinbidel.

2) Omoġenizzazzjoni tal-fwied

- Wahhal lida ġdida għall-omoġenizzazzjoni mal-omoġenizzatur tal-mikrotubu.
- Dahhal il-lida fil-mikrotubu ta' 1,5 ml. Żomm l-omoġenizzatur tal-mikrotubu biex tagħfas il-fwied bejn il-wiċċ tal-lida u l-hajt intern tal-mikrotubu ta' 1,5 ml.
- Haddem l-omoġenizzatur tal-mikrotubu għal 10 sa 20 sekonda. Matul l-operazzjoni kessah il-mikrotubu ta' 1,5 ml b'silġ imfarrak.

▼ **M7**

- Nehhi l-lida mill-mikrotubu ta' 1,5 ml u halliha tistrieħ għal madwar 10 sekondi. Imbagħad spezzjona viżwalment l-istat tas-sospensjoni.
- Jekk tara biċċiet ta' fwied fis-sospensjoni, irripeti l-operazzjonijiet (3) u (4) biex thejji omoġenat sodisfaċenti tal-fwied.
- Kessah l-omoġenat tal-fwied sospiż fuq l-ixtilliera tas-silġ sakemm issir iċ-ċentrifugazzjoni.
- Biddel il-lida ma' wahda ġdida għal kull omoġenat.
- Omoġenizza l-fwied kollha bil-bafer omoġenat skont il-proċedura deskritta hawn fuq.

3) Ċentrifugazzjoni tal-omoġenat tal-fwied sospiż

- Ikkonferma li t-temperatura tal-kompartiment taċ-ċentrifugazzjoni imkessah tkun ta' $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- Dahhal il-mikrotubi ta' 1,5 ml li jkun fihom l-omoġenat tal-fwied sospiż f'ċentrifuga mkessha (aġġusta l-bilanċ jekk ikun hemm bżonn).
- Iċċentrifuga l-omoġenat tal-fwied sospiż f'13 000 g għal 10 min f'temperatura ta' $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Madankollu, jekk is-supernatanti ikunu ġew separati b'mod adegwat, il-forza ċentrifuga u l-ħin jistghu jiġu aġġustati skont il-bżonn.
- Wara ċ-ċentrifugazzjoni, ara li s-supernatanti jkunu separati b'mod adegwat (saff tal-wiċċ: lipidu, saff intermedju: supernatant, saff tal-qiegh: tessut tal-fwied). Jekk is-separazzjoni ma tkunx adegwata, erga' ċċentrifuga s-sospensjoni fl-istess kondizzjonijiet.
- Nehhi l-kampjuni kollha miċ-ċentrifuga mkessah u rrangahom fl-ordni tan-numru tal-kampjun fuq l-ixtilliera tas-silġ. Ara li ma terġax tissospendi kull saff li jkun ġie sseparat wara ċ-ċentrifugazzjoni.

4) Il-ġbir tas-supernatant

- Poġġi erba' mikrotubi ta' 0,5 ml biex fihom taħzen is-supernatant fl-ixtilliera tat-tubi.
- Iġbor 30 μl minn kull supernatant (separat bhala s-saff intermedju) bil-mikropipetta u poġġih f'wiehed mill-mikrotubi ta' 0,5 ml. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq il-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegh.
- Iġbor is-supernatant u qassmu fiż-żewġ mikrotubi l-oħra ta' 0,5 ml bl-istess mod kif deskritt hawn fuq.
- Iġbor il-bqija tas-supernatant bil-mikropipetta (jekk dan ikun jista' jsir: $\geq 100 \mu\text{l}$). Imbagħad itfa' s-supernatant fil-mikrotubu ta' 0,5 ml li jifdal. Ara li ma tiġborx il-lipidu fuq il-wiċċ jew it-tessut tal-fwied fis-saff tal-qiegh.
- Aghlaq l-ghatu tal-mikrotubu ta' 0,5 ml u iktib il-volum tas-supernatant fuq it-tikketta. Imbagħad kessah minnufih il-mikrotubi fuq l-ixtilliera tas-silġ.
- Biddel il-ponta tal-mikropipetta b'wahda ġdida għal kull supernatant. Jekk ikun hemm ammont kbir ta' lipidu mwahhal mal-ponta, ibdilha ma' wahda ġdida minnufih biex tiġi evitata kontaminazzjoni tal-estratt tal-fwied bix-xaham.

▼ **M7**

- Qassam is-supernatant ċentrifugat kollu f'erba' mikrotubi ta' 0,5 ml skont il-proċedura deskritta hawn fuq.
- Wara li tkun qassam is-supernatant fil-mikrotubi ta' 0,5 ml, poġġihom kollha fl-ixtilliera tat-tubi bit-tikketta ta' identifikazzjoni, u mbagħad iffriżahom fil-frīza minnufih. Jekk il-konċentrazzjonijiet tal-VTG jitkejlu eżatt wara l-pretrattament, zomm mikrotubu wiehed ta' 0,5 ml (li fih 30 µl ta' supernatant) kiesah fl-ixtilliera tat-tubi u ttrasferixxih fl-istazzjon tax-xogħol fejn se jsir l-assaġġ ELISA. F'dan il-każ, poġġi l-mikrotubi li fadal fl-ixtillieri tat-tubi u ffrizahom fil-frīza.
- Wara li tiġbor is-supernatant, armi l-fdalijiet b'mod adegwat.

Hażna tal-kampjun

Aħżen il-mikrotubi ta' 0,5 ml li jkun fihom is-supernatant tal-omoġenat tal-fwied f'temperatura ta' ≤ -70 °C sakemm jintużaw għall-ELISA.

Proċedura 3 A: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm mill-Vina / Arterja Kawdali

Eżatt wara li tingħata l-anestesija, il-pedunkulu kawdali jinqata' b'mod trażversali, u d-demm jittiehed mill-vina/arterja kawdali permezz ta' tubu kapillari mikroematokritiku eparinizzat. Il-volumi tad-demm iwarjaw minn 5 sa 15 µl skont id-daqs tal-huta. Mat-tubu mikrokapillari jiżdied volum indaqs ta' bafer ta' aprotinin (6 µg/ml f'PBS) u l-plażma tiġi sseparata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (5 minuti b'600 g). Il-plażma tiġi ngħar fit-tubi tat-test u tinhażen f'temperatura ta' -20 °C sakemm tiġi analizzata għall-vitellogenina jew għal proteini oħrajn ta' interess.

Proċedura 3 B: Żebra, Il-Ġbir ta' Demm permezz ta' Titqiba fil-Qalb

Biex jiġi evitat milli d-demm jikkoagula u l-proteini jiddegradaw, il-kampjuni jingabru f'bafer ta' salina b'bafer tal-Fosfat (PBS) li jkun fih eparina (1 000 unità/ml) u l-inibitur tal-proteazi aprotinin (2 TIU/ml). Bhala ingredjenti għall-bafer, huma rrakkomandati eparina, melħ tal-ammonijaka u aprotinin lijoofilizzat. Għall-kampjunar tad-demm, hija rrakkomandata siringa (1 ml) b'labra fissa rqiqqa (eż. Braun Omnikan-F). Is-siringa għandha timtela minn qabel b'bafer (madwar 100 µl) biex il-volumi żgħar tad-demm minn kull huta jitnehħew kompletament. Il-kampjuni tad-demm jittiehdu permezz ta' titqiba fil-qalb. L-ewwel il-hut għandu jiġi anestetizzat b'MS-222 (100 mg/l). Il-pjan xieraq ta' anestezija jippermetti sabiex l-utent jiddistingwi t-tahbita tal-qalb taż-żebra. Waqt li tkun qed ittaqqab il-qalb, zomm il-pistun tas-siringa taħt pressjoni baxxa. Il-volumi tad-demm li jistgħu jingabru jvarjaw bejn 20 — 40 mikrolitru. Wara t-titqiba tal-qalb, it-tahlita tad-demm/bafer għandha tintefa' fit-tubu tat-test. Il-plażma tiġi separata mid-demm permezz ta' ċentrifugazzjoni (20 min; 5 000 g) u għandha tinhażen f'temperatura ta' -80 °C sakemm tkun mehtieġa għall-analiżi.

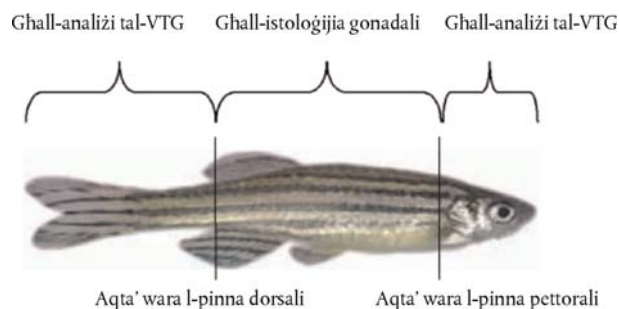
Proċedura 3C: SOP: Żebra, l-omoġenizzazzjoni tar-ras u tad-denb

1. Il-hut jiġi anestetizzat u ewtanizzat skont id-deskrizzjoni tat-test.
2. Ir-ras u d-denb jinqatgħu mill-huta skont il-Figura 1.

Importanti: *L-istrumenti kollha tad-dissezzjoni, u l-injama tat-tqattigh għandhom jitlahalhu u jitnaddfu sew (eż. b'96 % etanol) bejn l-immaniġġjar ta' kull huta biex jiġi evitat "tniġġis tal-vitellogenina" minn nisa jew irġiel indotti lil irġiel li ma ġewx indotti.*

▼ **M7**

Figura 1



3. Il-piż ikkombinat tar-ras u d-denb minn kull huta jitkejjel sal-eqreb mg
4. Wara li jintiżnu, il-partijiet jitpoġġew f'tubi adattati (eż. Eppendorf ta' 1,5 ml) u jiġu ffrizati f' – 80 °C sakemm jiġu omoġenizzati jew jiġu omoġenizzati direttament fuq is-silġ b'żewġ pistilli tal-plastik. (Jistgħu jintużaw metodi oħrajn jekk isiru fuq is-silġ u r-riżultat ikun massa omoġena). Importanti: *It-tubi għandhom jiġu nnumerati sew sabiex ir-ras u d-denb mill-huta jkunu jistgħu jiġu relatati mas-sezzjoni tal-ġisem rispettiva tagħhom użata għall-istologija gonadali.*
5. Meta tintlaħaq massa omoġena, jiżdied **bafer omoġenizzanti** ⁽¹⁾ kiesah silġ li jkun 4 darbiet il-piż tat-tessut. Kompli aħdem bil-pistili sakemm it-tahlita tkun omoġenja. Nota importanti: *Għal kull huta jintużaw pistili godda.*
6. Il-kampjuni jitqiegħdu fuq is-silġ sakemm issir ċentrifugazzjoni 4 °C b'50 000 x g għal 30 min.
7. Uża pipetta biex tqassam porzjonijiet ta' 20 µl ta' supernatant f'**mill-inqas** żewġ tubi billi tgħaddas il-ponta tal-pipetta taħt is-saff tax-xaħam fuq il-wiċċ u tiġbed bil-mod is-supernatant mingħajr frazzjonijiet ta' xaħam jew ta' gerbub.
8. It-tubi jinħażnu f'temperatura ta' – 80°C sakemm jiġu biex jintużaw.

⁽¹⁾ Bafer omoġenizzanti:

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % Koktejl ta' inibituri tal-proteazi (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Koktejl ta' inibituri tal-proteazi.
 — TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) eż. minn Bie & Berntsen, id-Danimarka.
 — Koktejl ta' inibituri tal-proteazi: Minn Sigma (għal tessut tal-mammiferi) Numru tal-prodott P 8340.

NOTA: Il-bafer omoġenizzanti għandu jintuża dakinhar stess meta jiġi manifatturat. Poġġi fuq is-silġ waqt li jkun qed jintuża.

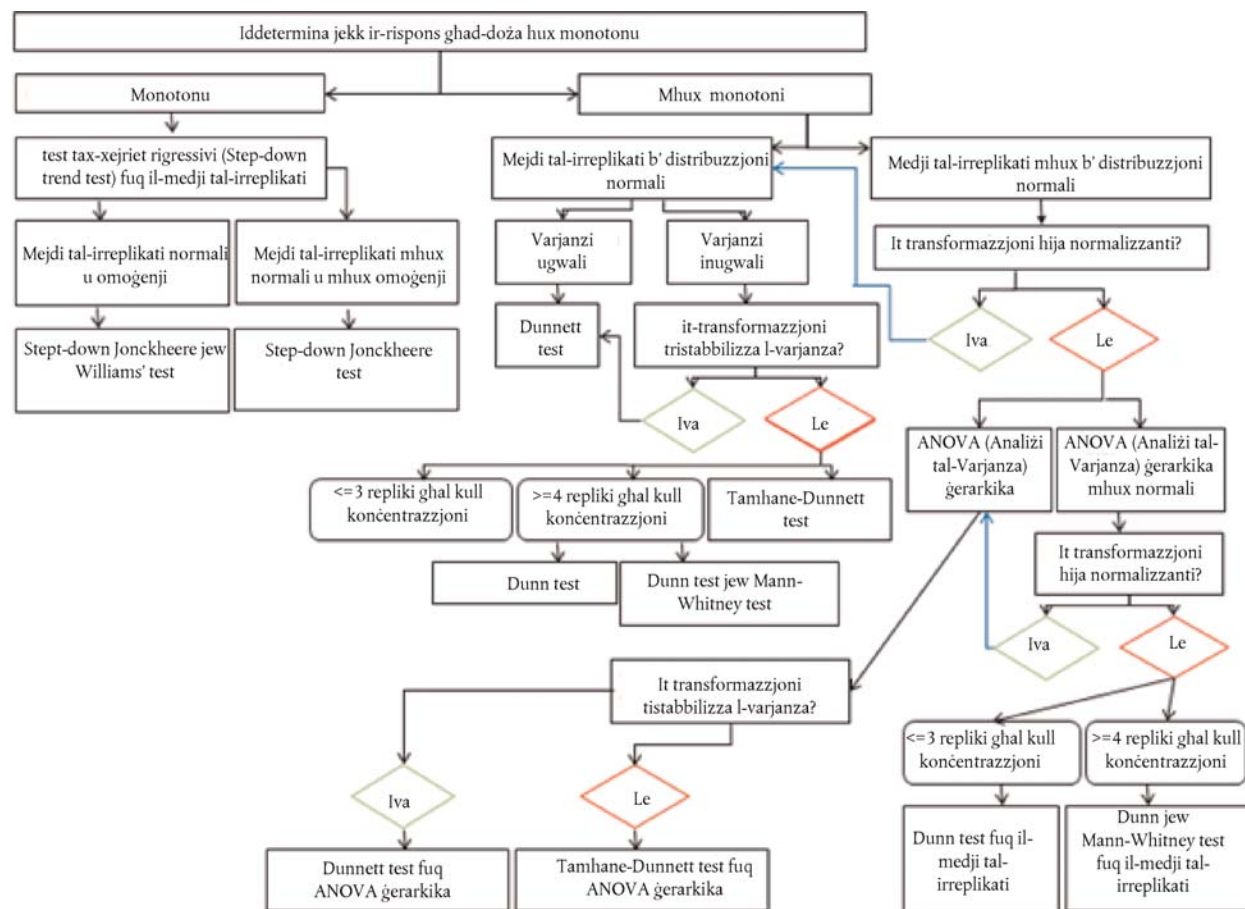
▼ **M7***Appendiċi 7***KAMPJUNI B'FORTIFIKAZZJONI TA' VITELLOĠENINA U STANDARD TA' REFERENZA INTERASSAĠĠ**

F'kull jum li jsiru l-assaġġi tal-vitellogenina, irid jiġi analizzat kampjun taż-żieda magħmul permezz ta' standard ta' referenza interassaġġ. Il-vitellogenina użata biex isir l-istandard ta' referenza interassaġġ għandha tkun minn lott differenti minn dak użat għat-thejjija ta' standards tal-kalibrazzjoni għall-assaġġ imwettaq.

Il-kampjun taż-żieda se jittiehed billi tiżdied kwantità magħrufa tal-istandard interassaġġ ma' kampjun ta' plazma tal-irġiel tal-kontroll. Il-kampjun ser jiġi miżjud sabiex tinkiseb konċentrazzjoni tal-vitellogenina bejn 10 u 100 darba l-konċentrazzjoni mistennija tal-vitellogenina tal-hut maskili ta' kontroll. Il-kampjun tal-plazma tal-irġiel tal-kontroll li huwa miżjud jista' jittiehed minn huta waħda jew jista' jkun ġej minn diversi hut.

Sottokampjun tal-plazma tal-irġiel tal-kontroll mhux miżjud se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ wells duplikati. Il-kampjun miżjud se jiġi analizzat f'tal-anqas żewġ wells duplikati wkoll. Il-kwantità medja tal vitellogenina fiż-żewġ kampjuni tal-plazma mhux miżjud tal-irġiel tal-kontroll tiżdied mal-kwantità kkalkolata tal-vitellogenina miżjud taż-żieda tal-kampjuni biex tiġi determinata konċentrazzjoni mistennija. Il-proporzjon ta' din il-konċentrazzjoni mistennija għall-konċentrazzjoni mkejla ser jiġi rrapportat flimkien mar-riżultati minn kull sett ta' assaġġi li jkunu saru dakinhar.

FLOWCHART DEĊIŻJONALI GHALL-ANALIŻI STATISTIKA



▼ **M7****C.49. TEST TAT-TOSSICITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAL-HUT (FET)****INTRODUZZJONI**

1. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) huwa ekwivalenti għal-linji gwida tal-OECD (TG) 236 (2013). Dan jiddeskrivi t-Test tat-Tossicità Akuta tal-Embrijuni tal-Hut (FET) bl-użu taż-żebra (*Danio rerio*). Dan it-test huwa maħsub biex jiddetermina t-tossicità akuta ta' sustanzi kimiċi fl-istadji embrijoniċi tal-hut. It-test FET huwa bbażat fuq studji u attivitajiet ta' validazzjoni mwettqa fuq iż-żebra (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). It-test FET kien applikat b'suċċess għal firxa wiesgħa ta' sustanzi kimiċi li juru diversi modi ta' azzjoni, solubilitajiet, volatilitajiet u idrofobiċitajiet (riveduti f'15 u 16).
2. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Bajd taż-żebra li jkunu għadhom kif ġew fertilizzati jiġu esposti għas-sustanza kimika tat-test għal perjodu ta' 96 siegħa. Kull 24 siegħa, sa erba' osservazzjonijiet apikali jiġu rreġistrati bħala indikaturi tal-lealtà (6): (i) koagulazzjoni tal-bajd fertilizzat, (ii) nuqqas ta' formazzjoni somite, (iii) nuqqas ta' distakkament tat-tail-bud mill-borża tal-isfar tal-bajd, u (iv) nuqqas ta' taħbit tal-qalb. Fl-aħħar tal-perjodu ta' esponiment, it-tossicità akuta tiġi ddeterminata fuq il-bażi ta' riżultat pożittiv fi kwalunkwe wiehed mill-erba' osservazzjonijiet apikali rreġistrati, u l-LC₅₀ jiġi kkalkulat.

KUNSIDERAZZJONIJIET TAL-BIDU

4. It-tagħrif utli dwar il-karatteristiċi speċifiċi għas-sustanza jinkludi l-formula strutturali, il-piż molekulari, il-purità, l-istabilità fl-ilma u d-dawl, pK_a u K_{ow}, is-solubilità tal-ilma u l-pressjoni tal-fwar, kif ukoll ir-riżultati ta' test għal bijodegradabilità immedjata (TM C.4 (17) jew TM C.29 (18)). Is-solubilità u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jikkalkulaw il-kostant tal-liġi ta' Henry, li se jindika jekk it-telf minhabba l-evaporazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jistax isehh. Għandu jkun hemm metodu ta' min jorbot fuqu disponibbli, għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza fis-soluzzjonijiet tat-test, b'eżattezza magħrufa u rappurtata kif ukoll il-limitu ta' rivelazzjoni.
5. Jekk il-metodu ta' ttestjar jintuża għall-ittestjar ta' tahlita, il-kompożizzjoni tiegħu għandha, sa fejn ikun possibbli, tkun karatterizzata, eż. bl-identità kimika tal-kostitwenti tagħha, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet speċifiċi għas-sustanza tagħhom (ara l-paragrafu 4). Qabel l-użu tal-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar regolatorju ta' tahlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk hux se jipprovi riżultati aċċettabbli għall-iskop regolatorju maħsub.
6. Rigward sustanzi li jistgħu jiġu attivati permezz tal-metabolizmu, hemm evidenza li l-embrijuni taż-żebra għandhom kapaċitajiet tal-bijotrasformazzjoni (19)(20)(21)(22). Madankollu, il-kapaċità metabolika tal-hut embrijoniku mhix dejjem simili għal dik ta' hut żgħir jew adult. Pereżempju, il-protosikant alkohol allyl (9) huwa nieqes fil-FET. Għalhekk, jekk ikun hemm xi indikazzjonijiet li metaboliti jew prodotti tat-trasformazzjoni ta' rilevanza oħrajn jistgħu jkunu aktar tossiċi mill-kompost oriġinarju, huwa wkoll rakkomandat li jitwettaq it-test b'dawn il-metaboliti/prodotti tat-trasformazzjoni u li jużaw dawn ir-riżultati meta jagħmlu konkluzjoni dwar it-tossicità tas-sustanzi kimiċi tat-test, jew inkella jwettqu test ieħor li jiehu aktar kont tal-metabolizmu.
7. Għal sustanzi b'piż molekulari $\geq 3\text{kDa}$, struttura molekulari goffa hafna, u sustanzi li jikkawżaw tfaqqs imdewwem jew inaqqsu l-esponiment ta' wara t-tfaqqs, l-embrijuni mħumiex mistennija li jkunu sensitivi minhabba bijo-disponibbiltà limitata tas-sustanza, u testijiet tat-tossicità oħra jistgħu jkunu aktar xierqa.

▼M7**VALIDITÀ TAT-TEST**

8. Biex ir-riżultati tat-test ikunu validi, japplikaw il-kriterji li ġejjin:
- a) Ir-rata tal-fertilizzazzjoni ġenerali tal-bajd kollha miġbura għandha tkun $\geq 70\%$ fil-grupp ittestjat.
 - b) It-temperatura tal-ilma għandha tinżamm $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ fil-kompartiment tat-test fi kwalunkwe hin waqt it-test.
 - c) Is-sopravivenza totali tal-embrijuni fil-kontroll negattiv (dilwizzjoni-ilma), u, fejn rilevanti, fil-kontroll tas-solvent għandha tkun $\geq 90\%$ sal-aħħar tal-esponiment ta' 96 siegħa.
 - d) Esponiment għall-kontroll pożittiv (eż. 4.0 mg/l 3,4-dikloroanilina għaž-żebra) għandu jirriżulta f'mortalità minima ta' 30 % fl-aħħar tal-esponiment ta' 96 siegħa.
 - e) Ir-rata tat-tfaqqis fil-kontroll negattiv (u kontroll tas-solvent jekk xieraq) għandha tkun $\geq 80\%$ fit-tmiem tal-esponiment ta' 96 siegħa.
 - f) Fl-aħħar tas-96 siegħa esponiment, il-konċentrazzjoni tal-ossigenu mahlul fil-kontroll negattiv u fil-konċentrazzjoni tal-oghla test għandha tkun ta' $\geq 80\%$ tas-saturazzjoni.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

9. Harsa ġenerali tal-kundizzjonijiet rakkomandati tal-manutenzjoni u tat-test hija disponibbli fl-Appendiċi 2.

Tagħmir

10. Huwa meħtieġ it-tagħmir li ġej:
- a) Tankijiet tal-hut magħmula minn materjal kimiku inert (eż. ħġieġ) u ta' kapaċità adattata rigward tat-tagħbija rakkomandata (ara "Manutenzjoni tal-hut riproduttur", paragrafu 14);
 - b) Mikroskopju maqlub u/jew binokulari b'kapaċità ta' tkabbir ta' mill-inqas 80 darba. Jekk il-kamra li tintuża għar-reġistrazzjoni tal-osservazzjonijiet ma tistax tiġi aġġustata għal $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, l-istadju tal-moviment laterali bit-temperatura kkontrollata jew metodi oħrajn biex tinżamm it-temperatura huma meħtieġa;
 - c) Kmamar tat-test; eż., 24-well plates standard b'fond ta' madwar 20 mm. (ara "Kmamar tat-test", paragrafu 11);
 - d) eż., fojl li jehel waħdu biex jgħatti l-24 well-plates;
 - e) Inkubatur jew kamra bl-arja kundizzjonata bit-temperatura kontrollata, li tippermetti li tinżamm $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ fil-bjar (jew fil-kmamar tat-test);
 - f) miter tal-pH;
 - g) Ossigenometru;
 - h) Apparat għad-determinazzjoni tal-ebusija tal-ilma u l-konduttività;
 - i) Nassa tal-bajd: trejs tal-istrumenti tal-ħġieġ, azzar inossidabbli jew materjali inert oħra; malja tal-hadid (daqs tal-gradilja ta' $2 \pm 0.5\text{ mm}$) tal-azzar inossidabbli jew materjal inert ieħor li jipproteġi l-bajd meta jinbiedu; sottostrat riproduttiv (eż. imitazzjonijiet ta' pjanti ta' materjal inert) (TM C.48, Appendiċi 4a (23));
 - j) Pipetti bi ftuħ imwessa' sabiex jiġbru l-bajd;

▼ M7

- k) Reċipjenti tal-ħġieġ biex jippreparaw konċentrazzjonijiet tat-test differenti u ilma għat-trattib (beakers, flasks gradwati, ċilindri gradwati u pipetti gradwati) jew biex jiġbru l-bajd taż-żebra (eż. beakers, dixxijiet tal-kristallizzazzjoni);
- l) Jekk sistemi tal-esponiment alternattivi, bħall-fluss (24) jew id-dozaġġ passiv (25) jintużaw biex isir it-test, huma meħtieġa faċilitajiet u tagħmir xierqa.

Kompartimenti tat-test

11. Għandhom jintużaw kompartimenti tat-test tal-ħġieġ jew tal-polistiren (eż. 24-well plates b'kapacità tal-mili ta' 2.5-5 ml għal kull bir). Fil-każ li jkun hemm suspett tal-adsorbiment tal-polistiren (eż., għal sustanzi mhux polari, ċatti b' K_{OW}) għoli, għandhom jintużaw materjali inertji (ħġieġ) biex jitnaqqas it-telf minhabba l-adsorbiment (26). Kompartimenti tat-test għandhom ikunu ppożizzjonati b'mod każwali fl-inkubatur.

Kundizzjonijiet tal-ilma u tat-test

12. Hija rrakkomandata dilwizzjoni tal-ilma tal-manutenzjoni biex jinkisbu livelli ta' ebusija tipiċi ta' varjetà wiesgħa ta' ilmiġiet tal-wiċċ. L-ilma tad-dilwizzjoni għandu jiġi ppreparat minn ilma rikostitwit (27). L-ammont ta' ġebbla li jirrizulta li jkun fih l-ilma għandu jkun ekwivalenti għal 100-300 mg/l $CaCO_3$ sabiex tiġi evitata preċipitazzjoni eċċessiva tal-karbonat tal-kalċju. Jista' jintuża ilma b'wiċċ karatterizzat tal-bir ieħor jew ilma tal-bir. L-ilma rikostitwit jista' jiġi adattat għal ilma tal-manutenzjoni b'ammont baxx ta' melh minn diluzzjoni ma' ilma dejonizzat sa proporzjon ta' 1:5 għal ebusija minima ta' 30-35 mg/l $CaCO_3$. L-ilma huwa arjat għas-saturazzjoni tal-ossiġenu qabel iż-żieda tal-kimika tat-test. It-temperatura għandha tinżamm 26 ± 1 °C, fil-bjar, matul it-test. Il-pH għandu jkun f'medda ta' bejn pH 6.5 u 8.5, u ma jvarjax f'din il-medda b'aktar minn 1.5 unità matul it-test. Jekk il-pH mhux mistenni li jibqa' f'din il-medda, għandu jsir aġġustament tal-pH qabel ma jinbeda t-test. L-aġġustament tal-pH għandu jsir b'tali mod li l-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħażna ma tinbidilx b'xi mod sinifikanti u li l-ebda reazzjoni kimika jew preċipitazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tiġi kkawżata. L-użu tal-klorur tal-idroġenu (HCl) u l-idrossidu tas-sodju (NaOH) biex jikkoreġu l-pH fis-soluzzjonijiet li jkun fihom is-sustanza kimika tat-test huwa rrakkomandat.

Is-soluzzjonijiet tat-test

13. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jistgħu jiġu ppreparati, eż. bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni tal-ħażna. Is-soluzzjonijiet tal-ħażna għandhom preferibbilment jiġu ppreparati billi sempliċement tithallat jew tithawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma tad-dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. billi thawwad jew bl-ultrasonifikazzjoni). Jekk is-sustanza kimika tat-test hija diffiċli biex tinhall fl-ilma, għandhom jiġu segwiti l-proċeduri deskritti fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD Nru 23 għall-ġestjoni ta' sustanzi u tahlitiet diffiċli għandhom jiġu segwiti (28). L-użu ta' solventi għandu jiġi evitat, iżda jista' jkun meħtieġ f'xi każijiet sabiex jipproduċi soluzzjoni tal-ħażna konċentrata b'mod xieraq. Fejn jintuża solvent biex jassisti fil-preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-ħażna, il-konċentrazzjoni finali tiegħu m'għandhiex taqbeż il-100 µl/l u għandha tkun l-istess fir-riċipjenti tat-test kollha. Meta jintuża solvent, huwa meħtieġ kontroll tas-solvent addizzjonali.

Manutenzjoni tal-hut riproduttiv

14. Il-ħażna għat-trobbija taż-żebra mhux espost u tat-tip selvaġġ b'rata ta' fertillizzazzjoni tal-bajd dokumentata sew tintuża għall-produzzjoni tal-bajd. Il-hut għandu jkun hieles minn sintomi makroskopikament dixxernibbli ta' infezzjoni u mard u m'għandux ikun sarlu kwalunkwe trattament farmaċewtiku (akut jew profilattiku) għal xahrejn qabel ir-riproduzzjoni. Il-hut riproduttiv jinżamm f'akwarji b'kapacità tat-tagħbija rrakkomandata ta' 1 l ilma

▼ **M7**

għal kull huta u fotoperjodu fiss ta' 12 — 16-il siegħa (29)(30)(31)(32)(33). Ir-rati ta' filtrazzjoni ottimali għandhom jiġu aġġustati; rati ta' filtrazzjoni li jikkawżaw perturbazzjoni żejda tal-ilma għandhom jiġu evitati. Għal kundizzjonijiet tal-għalf, ara Appendiċi 2. Għandu jiġi evitat l-għalf żejjed, u l-kwalità tal-ilma u l-indafa tal-akwarji għandhom jiġu mmonitorjati b'mod regolari u jerġgħu jiġu ssettjati għall-istat inizjali, jekk ikun hemm bżonn.

Ittestjar tal-profiċjenza

15. Bhala sustanza kimika ta' referenza, 3,4-dikloroanilina (użat fl-istudji ta' validazzjoni (1)(2)), għandha tiġi ttestjata f'medda tar-rispons ta' koncentrazzjoni shiha biex tiġi ċċekkjata s-sensittività tar-razza tal-ħut użata, preferibbilment darbtejn f'sena. Għal kwalunkwe laboratorju li jistabbilixxi inizjalment dan l-assaġġ, għandha tintuża s-sustanza kimika ta' referenza. Laboratorju jista' juża din is-sustanza kimika biex juri l-kompetenza teknika tagħhom fit-twettiq tal-assaġġ qabel jissottometti d-dejta għal skopijiet regolatorji.

Produzzjoni tal-bajd

16. Bajd taż-zebra jistgħu jiġu prodotti permezz ta' gruppi riproduttivi (f'tankijiet riproduttivi individwali) jew permezz ta' riproduzzjoni tal-massa (fit-tankijiet tal-manutenzjoni). Fil-każ ta' gruppi tar-riproduzzjoni, irġiel u nisa (eż., fi proporzjon ta' 2:1) fi grupp tat-tgħammir jitpoġġew f'tankijiet riproduttivi f'it sigħat qabel il-bidu ta' meta jidlam fil-jum ta' qabel it-test. Peress li gruppi tar-riproduzzjoni taż-zebra jistgħu kultant jonqsu milli jbidu, l-użu parallel ta' mill-inqas tliet tankijiet riproduttivi huwa rakkomandat. Biex jiġi evitat ix-xaqlib ġenetiku, il-bajd jingabar minn minimu ta' tliet gruppi tat-tgħammir, imħallta u magħżula b'mod każwali.
17. Għall-ġbir tal-bajd, nases tar-riproduzzjoni jitpoġġew fit-tankijiet tar-riproduzzjoni jew fit-tankijiet tal-manutenzjoni qabel il-bidu ta' meta jisbah fil-jum tat-test. Biex tkun evitata l-predazzjoni tal-bajd minn zebra adulti, in-nases tar-riproduzzjoni huma miksijin b'malja tal-hadid inerti ta' daqs xieraq (madwar 2 ± 0.5 mm). Jekk jitqies neċessarju, jistgħu jitwawhlu pjanti arti-fiċjali magħmula minn materjal inerti (eż., plastik jew ħġieġ) mal-malja bhala stimolu riproduttiv (3)(4)(5)(23)(35). Għandhom jintużaw materjali tal-plastik użati li ma jifiltrawx (eż., fitalati). It-tgħammir, ir-riproduzzjoni u l-fertilizzazzjoni jseħħu fi żmien 30 minuta wara l-bidu tad-dawl u n-nases tar-riproduzzjoni bil-bajd miġbur jistgħu jitnehhew b'attenzjoni. Huwa rakkomandat it-tlaħliħ tal-bajd b'ilma rikostitwit wara li jingabru min-nases tar-riproduzzjoni.

Id-differenzjazzjoni tal-bajd

18. F'26 °C, il-bajd fertilizzat jgħaddi mill-ewwel qasma wara madwar 15-il minuta u l-qasmiet konsekuttivi sinkroniċi jiffurmaw 4, 8, 16 u 32 blastomers taċ-ċellola (ara Appendiċi 3)(35). F'dawn l-istadi, il-bajd fertilizzat jista' jiġi identifikat b'mod ċar mill-iżvilupp ta' blastula.

PROCEDURA**Kundizzjonijiet tal-esponiment**

19. Għoxrin embrijun għal kull koncentrazzjoni (embrijun wiehed għal kull bir) huma esposti għas-sustanza kimika tat-test. L-esponiment għandu jkun b'tali mod li ± 20 % tal-koncentrazzjoni nominali kimika tinzamm matul it-test. Jekk dan mhux possibbli fis-sistema statika, għandu jiġi applikat intervall maniġġevoli semistatiku (eż. tiġdid kull 24 siegħa). F'dawn il-każijiet il-koncentrazzjonijiet tal-esponiment jehtieġu jiġu vverifikati bhala minimu fl-ogħla u l-inqas koncentrazzjonijiet tat-test fil-bidu u fit-tmiem ta' kull intervall tal-esponiment (ara l-paragrafu 36). Jekk koncentrazzjoni ta' esponiment ta' ± 20 % tal-koncentrazzjonijiet nominali ma tistax tiġi sostnuta, il-koncentrazzjonijiet għandhom bżonn jitkejlu fil-bidu u fit-tmiem ta' kull

▼ M7

intervall tal-esponiment (ara l-paragrafu 36). Waqt it-tigdid, għandha tinghata attenzjoni li l-embrijuni jibqgħu miksijin b'ammont żgħir tas-soluzzjonijiet tat-test qodma biex ikun evitat li jinxfu. Id-disinn tat-test jista' jiġi adattat biex jissodisfa r-rekwiżiti tat-test ta' sustanzi speċifiċi (eż., fluss kontinwu (24) jew sistemi tad-dożaġġ passivi (25) għal sustanzi faċilment degradabbli jew adsorbivi hafna (29), jew oħrajn għal sustanzi volatili (36)(37)). Fi kwalunkwe każ, għandha tinghata attenzjoni biex jitnaqqas kwalunkwe stress lill-embrijuni. Il-kompartimenti tat-test għandhom jiġu kkondizzjonati mill-inqas għal 24 siegħa bis-soluzzjonijiet tat-test qabel il-bidu tat-test. Il-kundizzjonijiet tat-test huma miġbura fil-qosor fl-Appendiċi 2.

Konċentrazzjonijiet tat-test

20. Normalment, hames konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test spazjati b'fattur kostanti li ma jaqbiżx it-2.2 huma mehtieġa biex jiġu ssodisfati r-rekwiżiti statistiċi. Għandha tinghata ġustifikazzjoni jekk jintużaw inqas minn hames konċentrazzjonijiet. L-ogħla konċentrazzjoni ttestjata għandha preferibbilment tirriżulta f'letalità ta' 100 %, u l-inqas konċentrazzjoni ttestjata preferibbilment ma għandha tagħti l-ebda effett osservabbli, kif definit fil-paragrafu 28. Test tat-tfittix tal-medda qabel it-test definittiv jippermetti l-għażla tal-firxa tal-konċentrazzjoni xierqa. It-tiftix tal-medda normalment jitwettagħ bl-użu ta' għaxar embrijuni għal kull konċentrazzjoni. L-istruzzjonijiet li ġejjin jirreferu għat-twettiq tat-test f'24-well plates. Jekk jintużaw kompartimenti tat-test differenti (eż. dixxijiet Petri żgħar) jew jiġu ttestjati aktar konċentrazzjonijiet, l-istruzzjonijiet għandhom jiġu aġġustati kif jixraq.
21. Dettalji u struzzjonijiet viżwali għall-allokazzjoni ta' konċentrazzjonijiet tul l-24-well plates huma disponibbli fil-paragrafu 27 u l-Appendiċi 4, Figura 1.

Kontrolli

22. Huma mehtieġa kontrolli tal-ilma tad-dilwizzjoni kemm bħala kontroll negattiv kif ukoll bħala kontrolli tal-plate interni. Jekk jiġi osservat aktar minn embrijun 1 mejjiet fil-kontroll tal-plates, il-plate tiġi rriřjutata, b'hekk jonqos l-għadd ta' konċentrazzjonijiet użati biex tinkiseb l-LC₅₀. Jekk plate shiha tiġi rriřjutata l-abbiltà li tevalwa u tagħraf l-effetti osservati tista' tkun aktar diffiċli, speċjalment jekk il-plate rriřjutata hija l-plate tal-kontroll tas-solvent jew plate li fiha embrijuni trattati jkunu affettwati wkoll. Fl-ewwel każ, it-test għandu jiġi ripetut. Fit-tieni wahda, it-telf ta' grupp(i) tat-trattament kollu minhabba mortalità tal-kontroll interna jista' jillimita l-hila li jiġu evalwati effetti u jiġu determinati l-valuri LC₅₀.
23. Isir kontroll pożittiv f'konċentrazzjoni fissa ta' 4 mg/l 3,4-dikloroanilina għal kull lott tal-bajd użat għall-ittestjar.
24. Fil-każ li jintuża solvent, grupp addizzjonali ta' 20 embrijun jiġi espost għas-solvent fuq 24-well plate separati, b'hekk ikunu qed iservu bħala kontroll tas-solvent. Biex it-test jiġi kkunsidrat aċċettabbli, is-solvent għandu jintwera li ma jkollu l-ebda effett sinifikanti fuq il-hin biex ifaqqas, biex jibqa' haj, jew jipproduċi kwalunkwe effett avvers iehor fuq l-embrijuni (ara paragrafu 8c).

Bidu tal-esponiment u durata tat-test

25. It-test jinbeda kemm jista' jkun malajr wara l-fertilizzazzjoni tal-bajd u jintemm wara 96 siegħa ta' esponiment. L-embrijuni għandhom ikunu mgħaddsa fis-soluzzjonijiet tat-test qabel tinbeda l-qasma blastodiska, jew, l-aktar tard, l-istadju 16 taċ-ċellola. Biex jibda l-esponiment b'dewmien minimu, jintgħażel mill-inqas id-doppju tan-numru tal-bajd mehtieġa għal kull grupp tat-trattament u dawn jiġu trasferiti fil-konċentrazzjonijiet u l-kontrolli rispettivi (eż. f'dixxijiet tal-kristallizzazzjoni 100 ml; il-bajd għandhom ikunu mgħottija għal kollox) mhux aktar tard minn 90 minuta wara l-fertilizzazzjoni.
26. Bajd fertilizzat vijabbli għandu jiġi separat minn bajd mhux fertilizzat u jiġi trasferit għal 24-well plates ikkundizzjonati minn qabel għal 24 siegħa u jergħu jintlew b'soluzzjonijiet tat-test ippreparati friski 2 ml fi żmien 180 minuta wara l-fertilizzazzjoni. Permezz tal-istereomikroskopija (preferibbilment tkabbir ta' ≥30-darba), jintgħażel bajd fertilizzat li għaddej minn qsim u

▼ **M7**

ma juri l-ebda irregolarità ovvja waqt il-qsim (eż. nuqqas ta' simetrija, formazzjoni ta' nfafet) jew korrimenti tal-korjon. Għall-ġbir u s-separazzjoni tal-bajd, ara l-Appendiċi 3, Grafika 1 u 3 u l-Appendiċi 4, Grafika 2.

Distribuzzjoni tal-bajd fl-24-well plates

27. Il-bajd huma mqasma f'well plates fin-numri li ġejjin (ara wkoll l-Appendiċi 4, Grafika 1)

- 20 bajda fuq plate waħda għal kull konċentrazzjoni tat-test;
- 20 bajda bħala kontroll tas-solvent fuq plate waħda (jekk ikun mehtieġ);
- 20 bajda bħala kontroll pożittiv fuq plate waħda;
- 4 bajdiet filma tad-dilwizzjoni bħala kontroll tal-plate intern fuq kull wiehied mill-plates t'hawn fuq;
- 24 bajda fl-ilma tad-dilwizzjoni bħala kontroll negattiv fuq plate waħda.

Osservazzjonijiet

28. Osservazzjonijiet apikali mwettqa fuq kull embrijun ittestjat jinkludu: koagulazzjoni tal-embrijuni, nuqqas ta' formazzjoni somite, nuqqas ta' distakkament tad-denb, u nuqqas ta' tahbit tal-qalb (Tabella 1). Dawn l-osservazzjonijiet jintużaw għad-determinazzjoni tal-leltalità: Kwalunkwe riżultat pożittiv f'wiehied minn dawn l-osservazzjonijiet ifisser li l-embrijun taż-żebra ikun mejjet. Barra minn hekk, it-tfaqqis huwa rreġistrat fil-gruppi tat-trattament u tal-kontroll fuq bazi ta' kuljum u jibda minn 48 siegħa. Osservazzjonijiet huma rreġistrati kull 24 siegħa, sal-aħħar tat-test.

Tabella 1

Osservazzjonijiet apikali tat-tossiċità akuta fl-embrijuni taż-żebra 24-96 siegħa wara l-fertilizzazzjoni.

	Hinijiet tal-esponiment			
	24 siegħa	48 siegħa	72 siegħa	96 siegħa
Embrijuni koagulati	+	+	+	+
Nuqqas ta' formazzjoni somite	+	+	+	+
Nuqqas ta' distakkament tad-denb	+	+	+	+
Nuqqas ta' tahbit tal-qalb		+	+	+

29. *Koagulazzjoni tal-embrijun*: Embrijuni koagulati huma bojod ħalib u jidhru skuri taht il-mikroskopju (ara l-Appendiċi 5, Grafika 1). In-numru tal-embrijuni koagulati huwa determinat wara 24, 48, 72 u 96 siegħa.
30. *Nuqqas ta' formazzjoni somite*: F'temperatura ta' 26 ± 1 °C, madwar 20 somites iffurmaw wara 24 siegħa (ara l-Appendiċi 5, Grafika 2) f'embrijun taż-żebra żviluppat normali. Embrijun żviluppat normali juri movimenti involontarji (kontrazzjonijiet minn ġenb għal ġenb). Movimenti involontarji jindikaw il-formazzjoni tas-somites. In-nuqqas ta' somites huwa rreġistrat wara 24, 48, 72 u 96 siegħa. In-nuqqas ta' formazzjoni ta' somites wara 24 siegħa jista' jkun dovut għal ittardjar ġenerali tal-iżvilupp. Mhux aktar tard minn 48 siegħa wara, il-formazzjoni tas-somites għandha tiġi żviluppata. Jekk le, l-embrijuni huma meqjusin mejta.
31. *Nuqqas ta' distakkament tad-denb*: F'embrijun taż-żebra li jiżviluppa normali, id-distakkament tad-denb (ara l-Appendiċi 5, Grafika 3) mill-isfar huwa osservat

▼ **M7**

wara li jitwal il-gisem embrijoniku. In-nuqqas ta' distakkament tad-denb huwa rreġistrat wara 24, 48, 72 u 96 siegħa.

32. *Nuqqas ta' tahbit tal-qalb*: F'embrijun taż-żebra li jiżviluppa normali f'temperatura ta' 26 ± 1 °C, it-tahbit tal-qalb huwa viżibbli wara 48 siegħa (ara l-Appendiċi 5, Grafika 4). Għandha tittiehed attenzjoni partikolari meta jiġi rreġistrat dan il-punt minhabba li tahbit tal-qalb irregolari (erratiku) *m'għandux* jiġi rreġistrat bħala letali. Barra minn hekk, tahbit tal-qalb viżibbli mingħajr iċ-ċirkolazzjoni fl-aorta abdominalis huwa kkunsidrat mhux letali. Biex jiġi rreġistrat dan l-effett, embrijuni li ma juru l-ebda tahbit tal-qalb għandhom jiġu osservati taht tkabbir minimu ta' 80x għal mill-inqas minuta. In-nuqqas ta' tahbit tal-qalb huwa rreġistrat wara 48, 72 u 96 siegħa.
33. Rati tat-tfaqqis tal-gruppi tat-trattament u tal-kontroll kollha għandhom jiġu rreġistrati minn 48-il siegħa l-quddiem u jiġu rappurtati. Għalkemm it-tfaqqis mhux effett użat għall-kalkolu tal-LC₅₀, it-tfaqqis jiżgura l-esponiment tal-embrijun mingħajr funzjoni ta' xkiel tal-korjon, u bħala tali jista' jgħin l-interpretazzjoni tad-dejta.
34. Deskrizzjonijiet dettaljati tal-iżvilupp normali (35) u eżempji ta' żvilupp anormali tal-embrijuni taż-żebra huma murija fl-Appendiċi 3 u 5.

Kejliet analitiċi

35. Fil-bidu u fit-tmiem tat-test, jitkejl l-pH, l-ebusija totali u l-konduttività fil-kontroll(i) u fl-ogħla konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test. F'sistemi tat-tiġdid semistatiċi, il-pH għandu jitkejjel qabel u wara t-tiġdid tal-ilma. Il-konċentrazzjoni ta' ossiġenu mahlul titkejjel fl-aħħar tat-test fil-kontrolli negattivi u fl-ogħla konċentrazzjoni tat-test b'embrijuni vijabbli, fejn għandha tkun f'konformità mal-kriterji tal-validità tat-test (ara l-paragrafu 8f). Jekk hemm tħassib li t-temperatura tvarja madwar l-24-well plates, it-temperatura titkejjel f' tliet reċipjenti magħżula b'mod każwali. It-temperatura għandha tiġi rreġistrata preferibbilment b'mod kontinwu matul it-test jew, bħala minimu, kuljum.
36. F'sistema statika, il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test għandha titkejjel, bħala minimu, fl-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test, iżda preferibbilment fit-trattamenti kollha, fil-bidu u fl-aħħar tat-test. F'testijiet semistatiċi (tat-tiġdid) fejn il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test tkun mistennija li tibqa' fi ± 20 % tal-valuri nominali, huwa rrakkomandat li, bħala minimu, l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test ikunu analizzati meta ppreparati friski u immedjatament qabel it-tiġdid. Għal testijiet fejn il-konċentrazzjoni tal-kimika tat-test mhux mistennija li tibqa' fi ± 20 % tal-valur nominali, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha għandhom jiġu analizzati meta ppreparati friski u immedjatament qabel it-tiġdid. Fil-każ ta' volum insuffiċjenti għall-analiżi, l-amalgamazzjoni tas-soluzzjonijiet tat-test, jew l-użu ta' kompartimenti surrogati li jkunu tal-istess materjal u li jkollhom l-istess volum tal-proporzjoni tal-wiċċ bħal 24-well plates, jistgħu jkunu utli. Huwa rrakkomandat hafna li r-riżultati jkunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet imkejla. Meta l-konċentrazzjonijiet ma jibqgħux fi hdan it-80-120 % tal-konċentrazzjoni nominali, il-konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom jiġu espressi fir-rigward tal-medja geometrika tal-konċentrazzjonijiet imkejla; ara l-Kapitolu 5 fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akwatika ta' Sustanzi u Tahlitiet Diffiċli għal aktar dettalji (28).

IT-TEST TAL-LIMITU

37. Permezz tal-proċeduri deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar, test tal-limitu jista' jitwettaq fuq 100 mg/l tas-sustanza kimika tat-test jew fil-limitu tas-solubilità fil-medium tat-test (liema minnhom ikun l-inqas) sabiex juri li l-LC₅₀ hija oghla minn din il-konċentrazzjoni. It-test tal-limitu għandu jitwettaq bl-użu ta' 20 embrijun fit-trattament, il-kontroll pożittiv u — jekk mehtiegħ — fil-kontroll tas-solvent u l-24 embrijun fil-kontroll negattiv. Jekk il-perċentwal

▼ **M7**

tal-lealtà fil-konċentrazzjoni ttestjata jaqbeż il-mortalità fil-kontroll negattiv (jew il-kontroll tas-solvent) b'10 %, għandu jitwettaq studju shih. Kwalunkwe effett osservat għandu jiġi rreġistrat. Jekk il-mortalità taqbeż l-10 % fil-kontroll negattiv (jew il-kontroll tas-solvent, it-test isir invalidu u għandu jiġi ripetut.

DATA U RAPPORTAR**Trattament tar-riżultati**

38. F'dan it-test, il-wells individwali huma kkunsidrati repliki indipendenti għall-analiżi statistika. Il-perċentwali tal-embrijuni li għalihom mill-inqas waħda mill-osservazzjonijiet apikali hija pożittiva f'48 u/jew 96 siegħa huma mmarrkati kontra l-konċentrazzjonijiet tat-test. Għall-kalkolu tal-inklinazzjonijiet tal-kurva, valuri LC_{50} u l-limiti tal-kunfidenza (95 %), għandhom jiġu applikati metodi statistiċi xierqa (38) u d-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Analiżi Statistika tad-Dejta tal-Ekotossicità għandu jiġi kkonsultat (39).

Rapport tal-ittestjar

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

*Sustanza kimika tat-test:**Sustanza monokostitwenti*

- dehra fiżika, solubilità fl-ilma, u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impurità jew bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet:

- karatterizzati kemm jista' jkun bl-identità kimika (ara hawn fuq), okkorrenza kwantitattiva u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Organizmi tat-test:

- isem xjentifiku, razza, sors u metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-użu sussegwenti.

Kundizzjonijiet tat-test:

- il-proċedura tat-test użata (eż., tiġdid semistatiku);
- fotoperjodu;
- id-disinn tat-test (eż., numru ta' kompartimenti tat-test, tipi ta' kontrolli);
- karatteristiċi tal-kwalità tal-ilma fil-manutenzjoni tal-hut (eż. pH, kemm fih ġebela, temperatura, konduttività, ossiġenu mahlul);
- konċentrazzjoni tal-ossiġenu mahlul, pH, ebusija totali, temperatura u konduttività tas-soluzzjonijiet tat-test fil-bidu u wara 96 siegħa;
- metodu ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-ħażna u soluzzjonijiet tat-test kif ukoll il-frekwenza tat-tiġdid;

▼ **M7**

- ġustifikazzjoni għall-użu ta' solvent u ġustifikazzjoni għall-ġhażla ta' solvent, jekk huwa xi haġa oħra barra ilma;
- il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test u r-riżultat tal-analizijiet kollha biex tiddetermina l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fir-reċipjenti tat-test; l-effiċjenza tal-irkupru tal-metodu u l-limitu ta' kwantifikazzjoni (LoQ) għandhom ukoll jiġu rrappurtati;
- evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji ġenerali tal-validità tas-sopravivenza;
- rata tal-fertilizzazzjoni tal-bajd;
- rata tat-tfaqqis fil-gruppi tat-trattament u tal-kontroll.

Riżultati:

- konċentrazzjoni massima li ma tikkawżax mortalità matul id-durata tat-test;
- konċentrazzjoni minima li tikkawża mortalità ta' 100 % matul id-durata tat-test;
- mortalità kumulattiva għal kull konċentrazzjoni fil-hinijiet tal-osservazzjoni rakkomandati;
- il-valuri LC₅₀ fis-96 siegħa (u possibbilment fit-48 siegħa) għall-mortalità b'limiti tal-kunfidenza ta' 95 %, jekk possibbli;
- grafika tal-kurva tal-konċentrazzjoni-mortalità fl-aħħar tat-test;
- il-mortalità fil-kontrolli (kontrolli negattivi, kontrolli interni tal-plate, kif ukoll kontroll pożittiv u kwalunkwe kontroll tas-solvent użat);
- dejta dwar ir-riżultat ta' kull wieħed mill-erba' osservazzjonijiet apikali;
- inċidenza u deskrizzjoni ta' anormalitajiet morfoloġiċi u fiżjoloġiċi, jekk ikun hemm (ara l-eżempji pprovduti fl-Appendiċi 5, Grafika 2);
- inċidenti fil-kors tat-test li setghu influwenzaw ir-riżultati;
- analiżi statistika u trattament tad-dejta (analiżi probit, mudell tar-rigressjoni loġistika u medja ġeometrika għal-LC₅₀);
- limiti tal-inklinazzjoni u tal-kunfidenza tar-rigressjoni tal-kurva tal-konċentrazzjoni-rispons (trasformata).

Kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu ta' ttestjar u spjegazzjonijiet rilevanti.

Diskussjoni u interpretazzjoni tar-riżultati.

TAGHRIF

- (1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.
- (2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼ **M7**

fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

- (4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
- (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
- (6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.
- (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. In Vitro 8: 401-406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.
- (13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryolaval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.
- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209
- (17) Chapter C.4 of this Annex: Ready Biodegradability.
- (18) Chapter C.29 of this Annex: Ready Biodegradability, CO₂ in sealed vessels.
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
- (23) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Fish Short Term Reproduction Assay.. Ara l-Appendiċi 4a.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436-1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097-4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
- (27) ISO (1996) International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Disponibbli: [<http://www.iso.org>].
- (28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccaac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Kummissjoni Ewropea (2007) Rakkomandazzjoni tal-Kummissjoni 2007/526/KE tat-18 ta' Ġunju 2007 dwar linji gwida għall-akkomodazzjoni u l-kura tal-annimali użati għal skopijiet sperimentali u oħrajn xjentifiċi (notifikat skont in-numru tad-dokument C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF>]
- (33) Unjoni Ewropea (2010) Direttiva 2010/63/UE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tat-22 ta' Settembru 2010 dwar il-protezzjoni tal-annimali użati għal skopijiet xjentifiċi. *Ġurnal Uffiċjali tal-Unjoni Ewropea*, L 276:33-79; 20.10.2010

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF>
- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *J. Appl. Ichthyol.* 2: 173-181.

▼M7

- (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- (36) Il-Kapitolu C.2 ta' dan l-Anness: *Daphnia* sp., Test tal-Immobilizzazzjoni Akuta.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1970-1978
- (38) ISO (2006) Standard Internazzjonali. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Disponibbli: [<http://www.iso.org>].
- (39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Dokument ta' revizjoni dettaljata "Fish embryo toxicity assays" Rapport UBA taht il-kuntratt Nru 20385422 Aġenzija Federali tal-Ambjent Germaniża, Berlin. 298 pp.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkaguna effett fil-livell tal-popolazzjoni.

Blastula: Formazzjoni ċellulari madwar il-pol tal-annimal li jkopri ċertu parti tal-isfar.

Sustanza Kimika: Sustanza jew tahlita

Epibolija: hija proliferazzjoni enormi ta' ċelloli fil-biċċa l-kbira epidermali fil-faġi tal-gastrulazzjoni tal-embrijun u l-moviment tagħhom mill-ġenb dorsali għal dak ventrali, li permezz tagħha s-saffi taċ-ċelloli entodermali huma internalizzati fi proċess simili għall-invaginazzjoni u l-isfar ikun inkorporat fl-embrijun.

Test tal-fluss kontinwu: Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Kontroll Intern tal-Plate: Il-kontroll intern jikkonsisti f'4 wells mimlija bl-ilma tad-dilwizzjoni għal kull 24-well plate biex jidentifika l-kontaminazzjoni potenzjali tal-plates mill-manifattur jew mir-riċerkatur waqt il-proċedura, u kwalunkwe effett tal-plate li potenzjalment jinfluwenza l-eżitu tat-test (eż. gradjent tat-temperatura).

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata

Manutenzjoni tal-ilma: Ilma li fih titwettaq it-trobbija tal-hut adult.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC₅₀): Il-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hija stmata li tkun letali għal 50 % tal-organizmi tat-test fid-durata tat-test.

Test tat-tigdid semistatiku: Test b'tigdid regolari tas-soluzzjonijiet tat-test wara perjodi definiti (eż., kull 24 siegħa).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

Somite: Fl-embrijun vertebrat li qed jiżviluppa, is-somites huma mases ta' mesoderm imqassma b'mod laterali mat-tubu newrali, li eventwalment jiżviluppa d-dermis (dermatom), fil-muskoli skeletali (mijotom), u vertebr (sklerotom).

It-test statiku: Test fejn is-soluzzjonijiet tat-test ma jinbidlux matul id-durata tat-test.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita ttestjata bl-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar

UVCB: Sustanzi ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodotti ta' reazzjoni kumplessa jew materjali bijoloġiċi

▼ M7

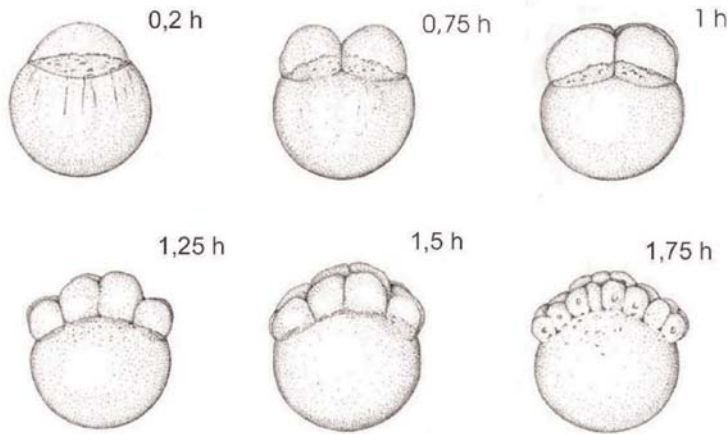
Appendiċi 2

MANUTENZJONI, TGHAMMIR U KUNDIZZJONIJIET TIPIĊI GHAT-TESTIJET TAT-TOSSIĊITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAŻ-ŻEBRA

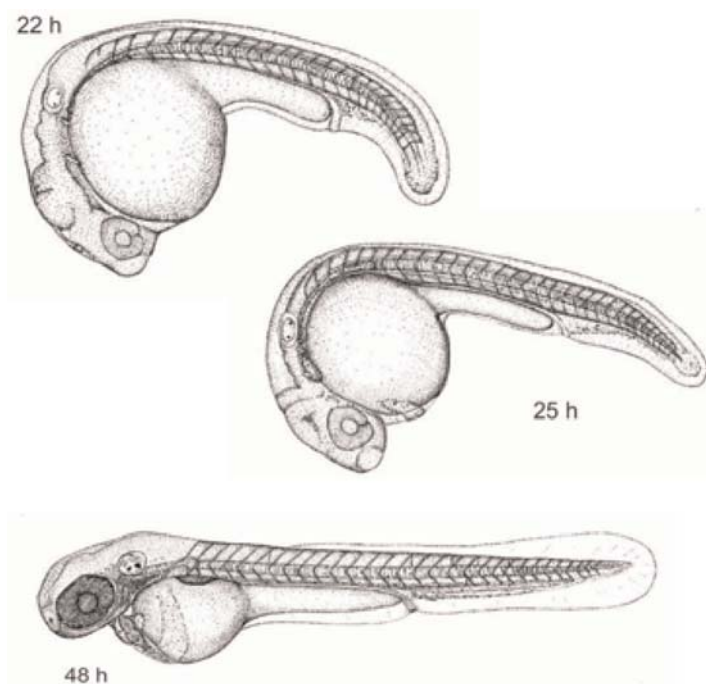
Żebra (<i>Danio rerio</i>)		
Origini tal-ispeċi		Indja, Burma, Malakka, Sumatra
Dimorfizmu sesswali		Nisa: żaqq tisporġi 'l barra, meta jgħorru l-bajd Irġiel: aktar irraq, lewn orangjo bejn strixxi longitudinali blu (partikolarment evidenti fix-xewka anali)
Reġim tal-ghalf		Frak tal-ikel xott (flake food) (mass. 3 % piż tal-hut fil-gurnata) 3 — 5 darba kuljum; addizzjonalment gambli tal-ilma mielah (<i>Artemia spec.</i>) nauplii u / jew daphnids żgħar ta' daqs xieraq miksuba minn sors mhux kontaminat. L-ghalf tal-ikel haj jipprovdi sors ta' arrikkiment ambjentali u għalhekk l-ikel haj għandu jingħata kull meta jkun possibbli. Biex ikun hemm garanzija għal kwalità tal-ilma ottimali, ikel u ppurgar żejda għandhom jitnehhew madwar siegħa wara l-ghalf.
Piż approssimattiv tal-hut adult		Nisa: 0,65 ± 0,13 g Irġiel: 0,5 ± 0,1 g
Manutenzjoni tal-hut ġenitur	Illuminazzjoni	Bozoz fluworexxenti (bi spettru wiesa); 10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, jew 50-100 ft-c (livelli tal-laboratorju ambjent); fotoperjodu ta' 12 sa 16-il siegħa
	Temperatura tal-ilma	26 ± 1 °C
	Il-kwalità tal-ilma	O ₂ ≥ 80 % saturazzjoni, ebusija: eż. ~ 30-300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤ 48mg/l, NH ₄ ⁺ u NO ₂ ⁻ : < 0,001 mg/l, kloru residwu < 10 µg/l, kloru organiku totali < 25 ng/l, pH = 6,5 – 8,5
	Aktar kriterji tal-kwalità tal-ilma	Materja f'partikoli < 20 mg/l, karbonju organiku totali < 2 mg/l, pesticidi organofosforiċi totali < 50 ng/l, pesticidi organokloriċi totali flimkien ma' bifenili poliklorinati < 50 ng/l
	Daqs tat-tank għall-manutenzjoni	eż. 180 l, 1 ħuta/l
	Tisfija tal-ilma	Permanenti (iffiltrata bil-faħam); possibbiltajiet ohra jinkludu kombinazzjonijiet b'manutenzjoni tat-tiġdid semistatika jew sistema tal-flus bit-tiġdid tal-ilma kontinwu
	Proporzjon tat-tniissil irġiel għal nisa rakkomandat	2:1 (jew riproduzzjoni tal-massa)
Tankijiet riproduttivi		eż. tankijiet ta' 4 l mgħammra b'qiegħ ta' gradilja tal-azzar u pjanta finta bħala stimulant għar-riproduzzjoni; twapet tas-shana esterni, jew riproduzzjoni tal-massa fit-tankijiet tal-manutenzjoni
Struttura u dehra tal-bajd		Korjon stabbli (jigħifieri trasparenti ħafna, li ma jwaxħalx, dijametru ~ 0,8-1,5 mm)
Rata tar-riproduzzjoni		Mara matura wahda tbid mill-inqas 50-80 bajda fil-gurnata. Skont ir-razza, ir-rati riproduttiva jistgħu jkunu konsiderevolment oghla. Ir-rata tal-fertilizzazzjoni għandha tkun ≥ 70 %. Għal hut li jbid l-ewwel darba, ir-rati tal-fertilizzazzjoni tal-bajd jistgħu jkunu inqas fl-ewwel ftit drabi li jbidu.
Tip ta' test		Kompartimenti tat-test statiči, tat-tiġdid semistatiku, tal-fluss, 26 ± 1 °C, 24 siegħa kondizzjonati (eż. 24-well plates 2,5-5 ml għal kull kavità)

▼ **M7**

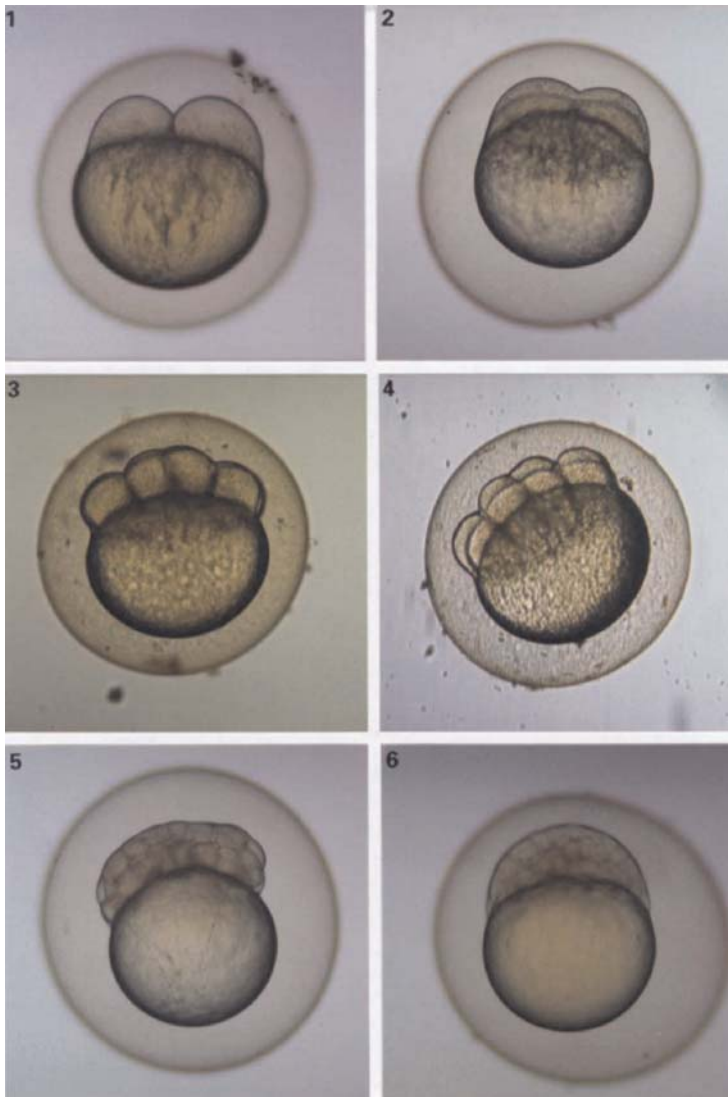
Appendiċi 3

ŻVILUPP NORMALI TAŻ-ŻEBRA F'26 °C

Grafika 1: Stadji magħżula tal-iżvilupp kmieni taż-żebra (*Danio rerio*): 0,2 — 1,75 siegħa wara l-fertilizzazzjoni (minn Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Is-sekwenza taż-żmien mill-iżvilupp normali tista' tittiehed għad-djanjosi kemm tal-fertilizzazzjoni kif ukoll tal-vijabbiltà tal-bajd (ara l-paragrafu 26: Għażla tal-bajd fertilizzat).



Grafika 2: Stadji magħżula tal-iżvilupp tard taż-żebra (*Danio rerio*) (embrijun dekorjonat biex jottimizza l-vizibbiltà): 22 — 48 siegħa wara l-fertilizzazzjoni (minn Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

▼ M7

Grafika 3: Żvilupp normali tal-embrijuni taż-żebra (*Danio rerio*): (1) 0,75 siegħa, stadju-2 tač-ċellola; (2) 1 siegħa, stadju-4 tač-ċellola; (3) 1,2 siegħa, stadju-8 tač-ċellola; (4) 1,5 siegħa, stadju-16 tač-ċellola; (5) 4,7 siegħa, bidu tal-epiboly; (6) 5,3 siegħa, madwar 50 % epiboly (minn Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

Grafika 1

Tqassim ta' 24-well plates

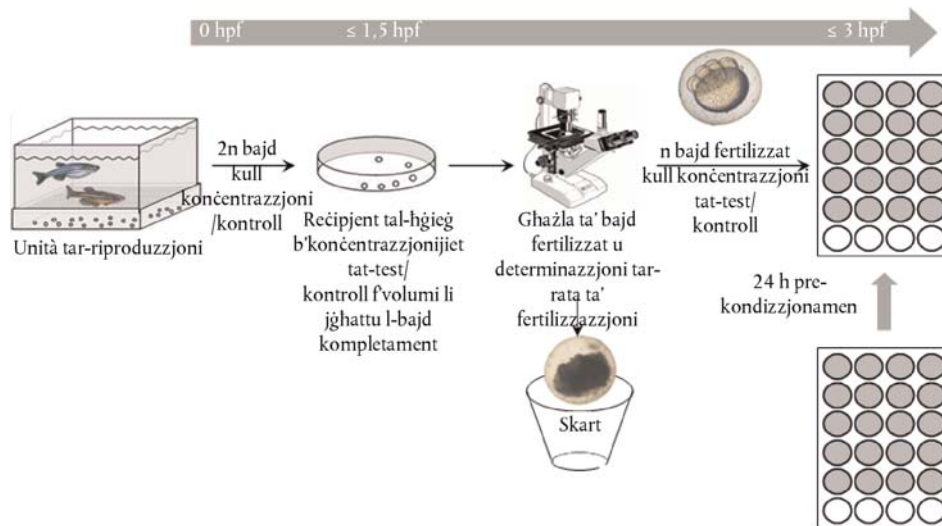
Figure 1 displays a 4x4 grid of 16 panels, each containing a 5x4 array of circles. The panels are organized into four columns and four rows. The first column shows the number '1' in gray circles. The second column shows the number '2' in gray circles. The third column shows the number '3' in gray circles. The fourth column shows the number '4' in gray circles. The first three rows show the same label in all circles, while the fourth row shows the label in gray circles and 'iC' in white circles. The labels are: 1, 2, 3, 4, iC, nC, pC, sC.

sC = kontroll tas-solvent

▼ **M7**

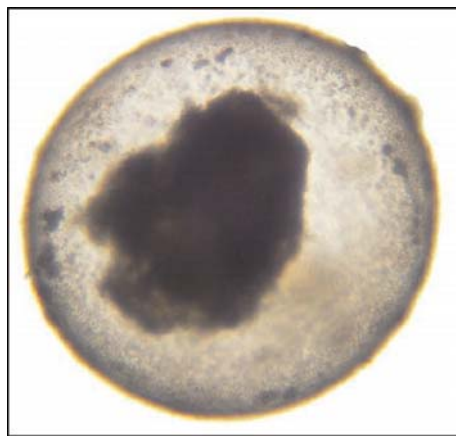
Grafika 2

Skema tal-proċess tat-test tat-tossicità akuta tal-embrijun taż-zebra (mix-xellug għal-lemin): produzzjoni tal-bajd, ġbir tal-bajd, esponiment minn qabel immedjatament wara l-fertilizzazzjoni f'reċipjenti tal-hġieġ, għażla tal-bajd fertilizzat b'mikroskopju maqlub jew binokulari u distribuzzjoni tal-bajd fertilizzat f'24-well plate ippreparata bil-konċentrazzjonijiet/kontrolli tat-test rispettivi, n = numru tal-bajd mehtieġ għal kull konċentrazzjoni/kontroll tat-test (hawn 20), hpf = sighat wara l-fertilizzazzjoni.

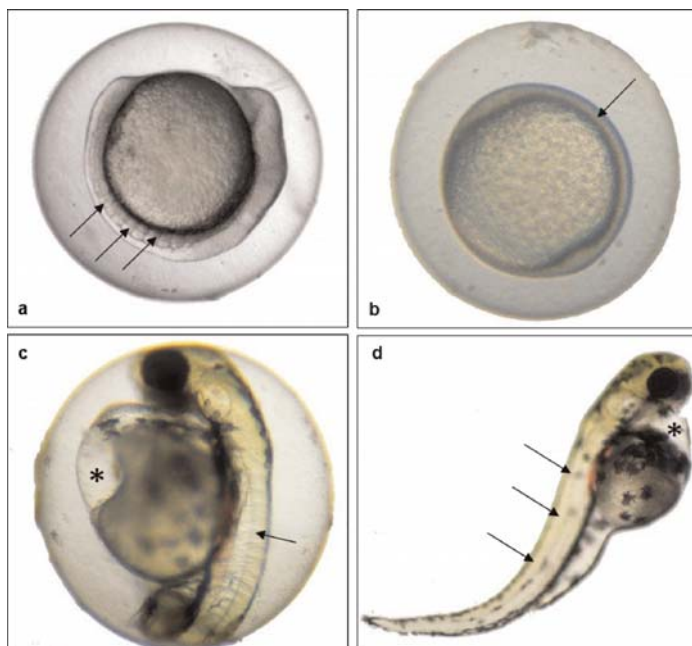


▼ **M7***Appendiċi 5***ATLAS TA' PUNTI TAT-TMIEM LETALI GHAT-TEST TAT-TOSSICITÀ AKUTA TAL-EMBRIJUNI TAŻ-ŻEBRA**

Il-punti tat-tmiem letali li ġejjin jindikaw tossiċità akuta u, konsegwentement, il-mewt tal-embrijuni: *koagulazzjoni tal-embrijun*, *nuqqas ta' distakk tad-denb*, *nuqqas ta' formazzjoni somite* u *nuqqas ta' taħbit tal-qalb*. Il-mikrografiċi li ġejjin intgħażlu biex juru dawn il-punti tat-tmiem.

*Grafika 1:***Koagulazzjoni tal-embrijun**

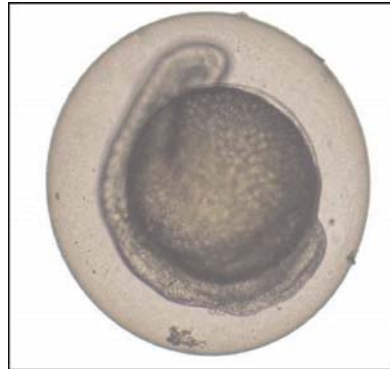
Taht illuminazzjoni qawwija, l-embrijuni koagulati taż-żebra juru varjetà ta' ink-lużjonijiet mhux trasparenti.

*Grafika 2:***Nuqqas ta' formazzjoni somite**

▼ **M7**

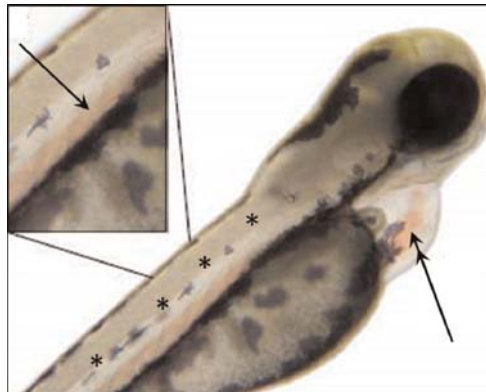
Għalkemm ritardati fl-iżvilupp b'madwar 10 sigħat, l-embrijun taż-żebrata ta' 24 siegħa f(a) juri somites żviluppati tajjeb (→), filwaqt li l-embrijun f(b) ma juri l-ebda sinjal ta' formazzjoni somite (→). Għalkemm juri edema tal-borża tal-isfar tal-bajda evidenti (*), l-embrijun taż-żebrata ta' 48 siegħa f(c) juri żvilupp distint tas-somites (→), filwaqt li l-embrijun taż-żebrata ta' 96 siegħa muri f(d) ma juri l-ebda sinjal ta' formazzjoni somite (→). Innota wkoll il-kurvatura tas-sinsla (skoljozi) u l-edema perikardjali (*) fl-embrijun murija f(d).

Grafika 3:

Nuqqas ta' distakkament

tal-boċċa tad-denb fid-dawl laterali (a: →; embrijun taż-żebrata ta' 96 siegħa). Innota wkoll in-nuqqas tal-boċċa tal-ghajn (*).

Grafika 4:

Nuqqas tat-tahbit tal-qalb

In-nuqqas tat-tahbit tal-qalb huwa, b'definizzjoni, diffiċli biex jintwera f'mikrografika. In-nuqqas tat-tahbit tal-qalb huwa indikat bin-nuqqas ta' konvulżjoni tal-qalb (vlegġa doppja). L-immobbiltà taċ-ċelloli tad-demem, eż. fl-aorta abdominalis (→ fid-dahla) mhix indikatur għal nuqqas ta' tahbit tal-qalb. Innota wkoll in-nuqqas ta' formazzjoni somite f'dan l-embrijun (*, dehra omogenja mhux segmentali tat-tessuti muskolari). Il-hin ta' osservazzjoni biex tirreġistra nuqqas ta' tahbit tal-qalb għandu jkun mill-inqas minuta bi tkabbir minimu ta' 80×.

▼ M7

C.50. MYRIOPHYLLUM SPICATUM HIELES MIS-SEDIMENT

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linji gwida tat-test OECD 238 (2014). Huwa mfassal biex jevalwa t-tossicità tas-sustanzi kimiċi għall-*Myriophyllum spicatum*, speċi tal-familja tal-ħaxixa tal-morliti tal-ilma. Huwa bbażat fuq metodu ta' ttestjar eżistenti ASTM (1) modifikat bħala sistema tat-test hielsa mis-sediment (2) biex jistima l-ekotossicità intrinsika tas-sustanzi kimiċi tat-test (indipendentement mill-imġiba tad-distribuzzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn l-ilma u s-sediment). Sistema tat-test mingħajr sediment għandha kumplessità analitika baxxa (fil-fażi tal-ilma biss) u r-riżultati jistgħu jiġu analizzati b'mod parallel u/jew f'paragun ma daww miksuba fit-test *Lemna sp.* (3); barra minn hekk, il-kundizzjonijiet sterili meħtieġa biex l-effetti tal-mikroorganizmi u tal-alka (assorbiment kimiku/degradazzjoni, eċċ.) jinżammu baxxi kemm jista' jkun. Dan it-test ma jissostitwixxi testijiet tat-tossicità akwatika oħrajn; minflok dan għandu jikkomplimentahom sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni aktar kompleta tal-periklu akwatiku tal-pjanti u tar-riskju. Dan il-metodu ta' ttestjar għe vvalidat permezz ta' ring-test (4).
2. Dettalji tal-ittestjar bit-tigdid (semistatiku) u mingħajr it-tigdid (statiku) tas-soluzzjoni tat-test huma deskritti. Skont l-oġettivi tat-test u r-rekwiżiti regolatorji, huwa rakkomandat l-użu tal-metodu semistatiku, eż. għal sustanzi li jintilfu malajr minn soluzzjoni bħala riżultat tal-volatilizzazzjoni, adsorbiment, fotodegradazzjoni, idrolizi, preċipitazzjoni jew bijodegradazzjoni. F'(5) tingħata gwida ulterjuri. Dan il-metodu ta' ttestjar japplika għal sustanzi li għalihom il-metodu ta' ttestjar għe vvalidat, (ara d-dettalji fir-rapport tar-ring test (4)) jew għal formulazzjonijiet, jew tahlitiet magħrufa; jekk tahlita tkun giet ittestjata, il-konstitwenti tagħha għandhom kemm jista' jkun jiġu identifikati u kwantifikati. Il-metodu ta' ttestjar *Myriophyllum spicatum* mingħajr sediment jikkomplimenta t-Test tat-Tossicità tas-sediment tal-ilma *Myriophyllum spicatum* (6). Qabel l-użu tal-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar ta' tahlita maħsuba għal skop regolatorju, għandu jiġi kkunsidrat jekk, u jekk ikun hekk għaliex, jista' jipprovi riżultati adegwati għal dan il-ghan. Tali kunsiderazzjonijiet mhumex meħtieġa, meta hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

3. Kulturi ta' pjanti li jikbru kontinwament ta' *Myriophyllum spicatum* (biss fil-medium Andrews modifikat, ara l-Appendiċi 2) huma permessi li jikbru bħala monokulturi f'konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test matul perjodu ta' 14-il ġurnata f'sistema tat-test mingħajr sediment. L-oġettiv tal-ittestjar huwa li jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi fuq it-tkabbir veġettativ matul dan il-perjodu abbażi ta' valutazzjonijiet tal-varjabbli ta' kejl magħżula. It-tkabbir tat-tul tar-rimja, tal-fergħat laterali u l-għeruq kif ukoll l-iżvilupp tal-piż frisk u niexef u zieda fis-sepali huma l-varjabbli tal-kejl. Barra minn hekk, jingħata kas tal-bidliet kwalitattivi distinti fil-organizmi tat-test, bħall-isfigurament jew il-klorozi u n-nekrozi indikati bil-kulur isfar jew abjad u kannella. Biex jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel ma' dak tal-kontrolli u l-konċentrazzjoni li ġġib inibizzjoni speċifikata x % tat-tkabbir li hija determinata u espressa bħala EC_x; "x" tista' tkun kwalunkwe valur skont ir-rekwiżiti regolatorji, eż. EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀. Għandu jiġi nnotat li l-istimi tal-valuri EC₁₀ u EC₂₀ huma biss affidabbli u xierqa f'testijiet fejn il-koeffiċjenti tal-varjazzjoni fil-pjanti tal-kontroll jaqgħu taħt il-livell tal-effett li qed ikun stmat, jiġifieri l-koeffiċjenti tal-varjazzjoni għandhom ikunu <20 % għal stima robusta ta' EC₂₀.
4. Kemm ir-rata tat-tkabbir medja speċifika (stmata minn evalwazzjonijiet tat-tul ewlieni tar-rimja u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali) u r-rendiment (stmat miż-zieda fit-tul ewlieni tar-rimja u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali) ta' pjanti mhux trattati u trattati għandhom jiġu determinati. Ir-rata speċifika

▼M7

tat-tkabbir (r) u r-rendiment (y) huma sussegwentement użati biex jiġu determinati $E_r C_x$ (e.g. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) u $E_y C_x$ (e.g. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$), rispettivament.

5. Barra minn hekk, jistgħu jiġu stabbiliti statistikament il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC).

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

6. Għandu jkun disponibbli metodu analitiku, b'sensittività xierqa għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-mezz tat-test. Informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test li tista' tkun utli biex jistabbilixxu l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, il-purità u l-impurità, is-solubilità tal-ilma, l-istabilità fl-ilma u fid-dawl, il-kostant tad-dissoċjazzjoni tal-aċidu (pK_a), il-koeffiċjent tal-partizzjoni oktanol-ilma (K_{ow}), il-pessjoni tal-fwar u l-bijodegradabbiltà. Is-solubilità fl-ilma u l-pessjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jiġi kkalkolat il-kostant ta' Henry's Law, li jindika jekk huwiex probabbli telf sinifikanti fis-sustanza kimika tat-test matul il-perjodu tal-ittestjar. Dan se jgħin biex jindika jekk għandhomx jittiehdu passi partikolari biex jiġi kkontrollat tali telf. Meta l-informazzjoni dwar is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test mhix ċerta, huwa rrakkomandat li din tiġi vvalutata skont il-kundizzjonijiet tat-test, jiġifieri medium tat-tkabbir, temperatura, reġim tad-dawl li għandhom jintużaw fit-test.
7. Il-kontroll tal-pH tal-medium tat-test huwa partikolarment importanti, eż. meta jiġu ttestjati metalli jew sustanzi li huma idrolitikament instabbli. Aktar gwida għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi b'karatteristiċi kimiċi fiżiċi li jagħmluha diffiċli biex isir it-test hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD (5).

VALIDITÀ TAT-TEST

8. Sabiex it-test ikun validu, il-hin tal-irduppar tat-tul tar-rimja prinċipali fil-kontroll għandu jkun inqas minn 14-il gurnata. Bl-użu tal-kundizzjonijiet tal-midja u tat-test deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar, dan il-kriterju jista' jinkiseb bl-użu ta' reġim tat-test statiku jew semistatiku.
9. Il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni għar-rendiment ibbazat fuq kejl tal-piż frisk tar-rimja (jiġifieri mill-bidu tat-test għat-terminazzjoni tat-test) u l-varjabbli tal-kejl addizzjonali (ara l-paragrafu 37) fil-kulturi ma jaqbzux il-35 % bejn ir-repliki.
10. Aktar minn 50 % tar-repliki tal-grupp ta' kontroll jinżammu sterili matul il-perjodu ta' esponiment ta' 14-il gurnata, li jfisser li jkunu viżibbilment hielsa mill-kontaminazzjoni minn organiżmi ohra bħall-alka, fungi u batterji (soluzzjoni ċara). *Nota:* Gwida dwar kif tiġi vvalutata l-isterilità hija pprovduta fir-rapport tar-ring-test (4).

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

11. Sustanza(i) ta' referenza, bħal 3,5-diklorofenol użat fir-ring test (4), jistgħu jiġu ttestjati bħala mezz tal-kontroll tal-proċedura tat-test. mid-dejta tar-ring test, il-valuri medji EC_{50} ta' 3,5-DCP għall-varjabbli tar-rispons differenti (ara l-paragrafi 37-41 ta' dan il-metodu ta' ttestjar) huma bejn 3.2 mg/l u 6.9 mg/l (ara r-rapport tar-ring test għal dettalji dwar l-intervall tal-kunfidenza għal dawn il-valuri). Huwa rrakkomandat li tiġi ttestjata sustanza kimika ta' referenza tal-inqas darbtejn f'sena jew, fejn jitwettagħ ittestjar bi frekwenza inqas, b'mod parallel mad-determinazzjoni tat-tossiċità ta' sustanza kimika tat-test.

▼ M7

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Taghmir

12. It-taghmir kollu f'kuntatt mal-media tat-test għandu jkun magħmul mill-ħġieg jew materjal kimikament inerti ieħor. L-oġġetti tal-ħġieg li jintużaw għal finijiet ta' kulturi u ttestjar għandhom jiġnaddfu minn kontaminanti kimiċi li jistgħu jinfiltrow fil-medium tat-test u għandhom ikunu sterili. Ir-reċipjenti tat-test għandhom ikunu twal biżżejjed għar-rimja fir-reċipjenti tal-kontroll biex jikbru fil-fażi tal-ilma mingħajr ma jilhqgħu l-wieċ tal-medium tat-test fl-aħħar tat-test. Huma rrakkomandati tubi tat-testijiet tal-ħġieg tal-borosilikat hoxnin mingħajr xoffa, dijametru ta' madwar 20 mm, tul ta' madwar 250 mm, b'tappijiet tal-aluminju.
13. Peress li l-medium Andrews modifikat fih is-sukrosju (li jstimula t-tkabbir tal-fungi u l-batterji), is-soluzzjonijiet tat-test għandhom jiġu ppreparati taħt kundizzjonijiet sterili. Il-likwidi kollha kif ukoll it-taghmir huma sterilizzati qabel l-użu. L-isterilizzazzjoni ssir permezz ta' trattament tal-arja msahhna (210 °C) għal 4 sigħat jew awtoklava għal 20 minuta f'121 °C. Barra minn hekk, il-flasks, dixxijiet, skutelli, eċċ. kollha u taghmir ieħor jgħaddu minn trattament tal-fjamma fuq workbench sterili eżatt qabel l-użu.
14. Il-kulturi u r-reċipjenti tat-test ma għandhomx jinżammu flimkien. Dan jint-lahaq bl-aħjar mod permezz ta' kompartimenti, inkubaturi, jew kmamar ta' tkabbir ambjentali separati. L-illuminazzjoni u t-temperatura għandhom ikunu kontrollabbli u jinżammu f'livell kostanti.

Organizmu tat-test

15. *Myriophyllum spicatum* — dikotiledon akwatiku mgħarraġ — huwa speċi tal-familja tal-haxixa tal-morliti tal-ilma. Bejn Gunju u Awwissu, fjuri roża-bojod mohbija jisporgu minn fuq il-wieċ tal-ilma. Il-pjanti huma miżrugħin fl-art permezz ta' sistema ta' rizomi robusti u jistgħu jinstabu fl-emisfera tat-tramuntana kollha f'ilmijiet kalmi ewtrofiċi, iżda mhux imniġġsa u aktar kalkiferi b'sottostrat tat-tajn. Il-*Myriophyllum spicatum* jippreferi l-ilma frisk, iżda jinsab fl-ilma salmastru wkoll.
16. Għat-test tat-tossicità mingħajr sediment, huma mehtieġa pjanti sterili. Jekk il-laboratorju tal-ittestjar ma jkollux kulturi regolari tal-*Myriophyllum spicatum*, il-materjal tal-pjanti sterili jista' jinkiseb minn laboratorju ieħor jew materjal tal-pjanti (mhux sterili) jista' jittiehed mill-post jew jiġi pprovdut minn fornitur kummerċjali; jekk il-pjanti jiġu mill-post, tkun prevista verifikazzjoni tassonomika tal-ispeċi. Jekk miġbura mill-post jew pprovduti minn fornitur kummerċjali, il-pjanti għandhom jiġu sterilizzati (1) u mizmuma f'kultura fl-istess medium bħal dak użat għall-ittestjar għal minimu ta' tmien ġimgħat qabel l-użu. Siti tal-kamp użati għall-għbir tal-kulturi tal-bidu għandhom ikunu hielsa minn sorsi ovvjii tal-kontaminazzjoni. Għandha tingħata attenzjoni kbira biex jiġi żgurat li l-ispeċi korretta tinkiseb meta tingabar il-*Myriophyllum spicatum* mill-post, speċjalment f'reġjuni fejn tista' tibridizza ma' speċi oħra *Myriophyllum*. Jekk miksuba minn laboratorju ieħor għandhom jinżammu b'mod simili għal minimu ta' tliet ġimgħat. Is-sors tal-materjal tal-pjanti u l-ispeċi użati għall-ittestjar dejjem għandhom jiġu rappurtati.
17. Il-kwalità u l-uniformità tal-pjanti użati għall-ittestjar sejjer ikollhom influwenza sinifikanti fuq l-eżitu tal-ittestjar u għandhom għalhekk jintgħazlu b'attenzjoni. Għandhom jintużaw pjanti żgħar li jikbru rapidament mingħajr leżjonijiet jew diskolorazzjoni (klorozi) evidenti. Dettalji dwar il-preparazzjoni tal-organizmu tat-test huma mogħtija fl-Appendiċi 4.

Kultivazzjoni

18. Biex titnaqqas il-frekwenza tal-manteniment tal-kultura (eż. meta l-ebda test għal *Myriophyllum* ma jkun ipplanat għal perjodu), il-kulturi jistgħu jinżammu taħt illuminazzjoni u temperatura mnaqqsa ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Id-dettalji tal-produzzjoni ta' kulturi huma mogħtija fl-Appendiċi 3.

▼ M7

19. Mill-inqas 14 sa 21 gurnata qabel l-ittestjar, huma trasferiti b'mod asettiku bizzejjed organiżmi tat-test f'medium sterili frisk u jiġu kkulturati għal 14 sa 21 gurnata taht il-kundizzjonijiet tat-test bħala kultura ta' qabel. Dettalji għall-preparazzjoni tal-pre-kultura huma mogħtija fl-Appendiċi 4.

Medium tat-test

20. Medium tan-nutrijent wiehed biss huwa rrakkomandat għall-*Myriophyllum spicatum* f'sistema tat-test hielsa mis-sediment, kif deskritt fl-Appendiċi 2. Modifika tal-medium Andrews hija rrakkomandata għall-kulturazzjoni u l-ittestjar bil-*Myriophyllum spicatum* kif deskritt f'(1). Minn hames soluzzjonijiet tal-hażna tan-nutrijenti ppreparati b'mod separat biż-żieda ta' 3 % sukrosju, se jiġi rranġat il-medium Andrews modifikat. Dettalji dwar il-preparazzjoni tal-medium huma mogħtija fl-Appendiċi 2.
21. Medium Andrews ikkonċentrat għaxar darbiet huwa meħtieġ biex jinkisbu s-soluzzjonijiet tat-test (bid-dilwizzjoni kif xieraq). Il-kompożizzjoni ta' dan il-medium hija mogħtija fl-Appendiċi 2.

Is-soluzzjonijiet tat-test

22. Is-soluzzjonijiet tal-ittestjar, ġeneralment jiġu ppreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjonijiet tal-hażna tas-sustanza kimika tat-test huma normalment ippreparati billi tinhall is-sustanza kimika f'ilma demineralizzat (jiġifieri distillat jew dejonizzat). Iż-żieda tan-nutrijenti se tinkiseb bl-użu tal-medium Andrews modifikat ikkonċentrat għaxar darbiet.
23. Is-soluzzjonijiet tal-hażna tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jiġu sterilizzati b'awtoklava f'121 °C għal 20 minuta jew bil-filtrazzjoni sterili, sakemm it-teknika tal-isterilizzazzjoni użata ma tiddenaturalizzax is-sustanza kimika tat-test. Soluzzjonijiet tat-test jistgħu jiġu ppreparati f'ilma jew f'medium sterili demineralizzat, taht kundizzjonijiet sterili. L-istabilità termali u l-adsorbiment fuq uċuħ differenti għandhom jitqiesu fl-għażla tal-proċedura tal-isterilizzazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-hażna tas-sustanza kimika tat-test. Minhabba dan, huwa rrakkomandat li s-soluzzjonijiet tal-hażna jiġu ppreparati taht kundizzjonijiet sterili, jiġifieri bl-użu ta' materjal sterili biex tinhall is-sustanza kimika tat-test taht kundizzjonijiet sterili (eż. sterilizzazzjoni bi fjamma, kapep għall-fluss luminari, eċċ.) f'ilma sterili. Din it-teknika tal-preparazzjoni tas-soluzzjonijiet tal-hażna sterili hija valida għaž-żewġ sustanzi u tahlitiet.
24. L-ogħla konċentrazzjoni ttestjata tas-sustanza kimika tat-test normalment m'għandhiex teċċedi s-solubbiltà tal-ilma taht il-kundizzjonijiet tat-test. Għal sustanzi kimiċi ta' solubbiltà tal-ilma baxxa jista' jkun meħtieġ li tiġi ppreparata soluzzjoni tal-hażna konċentrata jew dispersjoni tas-sustanza kimika bl-użu ta' solvent organiku jew dispersant sabiex jiffaċilita ż-żieda ta' kwantitajiet preċiżi tas-sustanza kimika tat-test għall-medium tat-test u jgħin fid-dispersjoni u x-xoljiment tiegħu. Għandu jsir kull sforz possibbli biex jiġi evitat l-użu ta' tali materjali. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossicità li tirriżulta mill-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi awżiljarji. Pereżempju, solventi li jintużaw b'mod komuni li ma jikkawżawx fitotossicità fil-konċentrazzjonijiet sa 100 µl/l jinkludu aċeton u dimetilformamid. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv, il-konċentrazzjoni finali tiegħu għandha tiġi rrapportata u miżmuma l-inqas possibbli ($\leq 100 \mu\text{l/l}$), u t-trattamenti u l-kontrolli kollha għandu jkollhom l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew aġent dispersiv. F'(5) tingħata gwida ulterjuri dwar l-użu ta' aġenti dispersivi.

Gruppi tat-test u ta' kontroll

25. Għarfien minn qabel tat-tossicità tas-sustanza kimika tat-test għal *Myriophyllum spicatum* minn test li jsib il-medda se jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa. Fit-test definittiv tat-tossicità, għandu normalment ikun hemm hames (bhal fit-test tal-inibizzjoni tat-tkabbir *Lemna*, Kapitolu C.26 ta' dan l-Anness) għal seba' konċentrazzjonijiet tat-test irranġati f'serje geometrika; għandhom jintagħzlu sabiex il-valuri NOEC u EC₅₀ jiġu kklassifikati skont il-medda tal-konċentrazzjoni (ara hawn taht). Preferibbilment il-fattur tas-separazzjoni bejn

▼ **M7**

il-konċentrazzjonijiet tat-test m'għandux jaqbez it-3.2; madankollu, jista' jintuża valur oġġetiv meta l-kurva tal-konċentrazzjoni-rispons tkun waħda ċatta. Għandha tingħata ġustifikazzjoni meta jintużaw inqas minn hames konċentrazzjonijiet. Mill-inqas għandhom jintużaw hames repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test.

26. Fl-istabbiliment tal-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test (għas-sejba tal-medda u/jew għat-test finali tat-tossicità), għandu jiġi kkunsidrat li ġej:

Għad-determinazzjoni ta' EC_x , il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex jiġi żgurat livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula EC_{50} , l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal- EC_{50} . Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkunu kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli.

Jekk l-għan huwa li jiġu stmati l-LOEC/NOEC, l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ma jkunx ferm iktar baxx minn dak tal-kontroll. Barra minn hekk, l-oġġetiv konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed biex b'hekk it-tkabbir ikun ferm inqas milli fil-kontroll. Jekk dan ma jkunx il-każ, it-test għandu jiġi ripetut permezz ta' medda ta' konċentrazzjoni differenti (sakemm l-oġġetiv konċentrazzjoni tkun fil-limitu tas-solubilità jew il-konċentrazzjoni limitu meħtieġa massima, eż. 100 mg/l).

27. Kull test għandu jinkludi kontrolli li jikkonsistu fl-istess medium tan-nutrient, organiżmu tat-test (l-għażla tal-materjal tal-pjanti l-aktar omogenja possibbli, friegħi laterali friski minn kulturi ta' qabel, imqassra għal 2.5 cm mill-bażi), kundizzjonijiet u proċeduri ambjentali bħala reċipjenti tat-test izda mingħajr is-sustanza kimika tat-test. Jekk jintuża solvent jew aġent dispersiv awżiljari, għandu jiġi inkluż trattament ta' kontroll addizzjonali bis-solvent/aġent dispersiv preżenti fl-istess konċentrazzjoni bħar-reċipjenti bis-sustanza kimika tat-test. In-numru ta' reċipjenti tal-kontroll ripetut (u reċipjenti tas-solvent, jekk applikabbli) għandu jkun mill-inqas għaxra.
28. Jekk ma tkunx meħtieġa determinazzjoni tal-NOEC, id-disinn tal-ittestjar jista' jiġi mmodifikat biex jiżdied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni. Madankollu, fi kwalunkwe każ in-numru ta' repliki tal-kontroll għandu jkun mill-inqas għaxra.

Esponiment

29. Friegħi laterali friski minn kultura minn qabel imqassra għal 2.5cm mill-bażi huma assenjati b'mod każwali fir-reċipjenti tat-test taħt kundizzjonijiet aseptiċi; kull reċipjent tat-test għandu jkun fih ferġha laterali ta' 2.5 cm li għandu jkollha meristem apikali fuq tarf wieħed. Il-materjal tal-pjanti magħżul għandu jkun tal-istess kwalità f'kull reċipjent tat-test.
30. Huwa meħtieġ disinn aleatorju għal-lokazzjoni tar-reċipjenti tat-test fl-inkubatur biex titnaqqas l-influwenza tad-differenzi spazjali fl-intensità tad-dawl jew it-temperatura. Huwa meħtieġ ukoll disinn ibblokkat jew pożizzjonar każwali tar-reċipjenti (jew pożizzjonar mill-ġdid aktar frekwenti) meta jsiru l-osservazzjonijiet.
31. Jekk test preliminari tal-istabilità juri li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test ma tistax tinżamm (jiġifieri l-konċentrazzjoni mkejla taqa' taħt it-80 % tal-konċentrazzjoni mkejla inizjali) matul id-durata tat-test (14-il ġurnata), huwa rakkomandat reġim tat-test semistatiku. F'dan il-każ, il-pjanti għandhom jiġu esposti għal test u soluzzjonijiet tal-kontroll ippreparati friski

▼ M7

mill-inqas f'okkazjoni waħda waqt it-test (eż. jum 7). Il-frekwenza ta' esponiment għal medium ġdid se tiddependi fuq l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test; jaf tkun meħtieġa frekwenza oġġla biex jinżammu koncentrazzjonijiet viċin għall-kostanti ta' sustanzi kimiċi volatili u mhux stabbli hafna.

32. Ix-xenarju ta' esponiment permezz ta' applikatur tal-weraq (sprej) mhuwiex kopert f'dan il-metodu ta' ttestjar;

Kundizzjonijiet tat-test

33. Dawl fluorexxenti baxx u/jew qawwi għandu jintuża biex jipprovdi irradjanza tad-dawl fil-firxa ta' madwar $100\text{--}150\ \mu\text{E m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ meta mkejjel bħala radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) f'punti fl-istess distanza mis-sors tad-dawl bħall-qieġ tar-reċipjenti tat-test (ekwivalenti għal ca. 6 000 to 9 000 lux) u bl-użu ta' ċiklu dawl-dlam ta' 16:8 h. Il-metodu ta' detezzjoni u kejl tad-dawl, b'mod partikolari t-tip ta' senser, se jgħid jaffettwa l-valur imkejjel. Is-sensers sferiċi (li jirrispondu għad-dawl minn angoli 'l fuq u taħt il-pjan ta' kejl) u s-sensers "cosine" (li jirrispondu għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl) huma ppreferuti minn sensers unidirezjonali, u ser jagħtu riżultati tal-qari oġġla, għal sors ta' dawl b'hafna punti tat-tip deskritt hawnhekk.
34. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test għandha tkun ta' $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$. Hija meħtieġa iktar attenzjoni f'kazijiet speċjali bħal meta jiġu ttestjati sustanzi kimiċi mhux stabbli jew metalli; il-pH għandu jibqa' fil-medda 6-9. Ara (5) għal gwida ulterjuri.

Durata

35. It-test jintemm 14-il jum wara li l-pjanti jiġu trasferiti fir-reċipjenti tat-test.

Kejl u determinazzjonijiet analitiċi

36. Fil-bidu tat-test, it-tul tar-rimja prinċipali tal-organizmu tat-test huwa 2.5 cm (ara l-paragrafu 29); huwa mkejjel b'riga (ara l-Appendiċi 4) jew bl-analiżi tal-fotografija jew l-immaġni. It-tul tar-rimja prinċipali ta' organismu tat-test li jidher normali jew anormali għandu jiġi determinat fil-bidu tat-test, mill-inqas darba waqt il-perjodu tal-esponiment ta' 14-il gurnata u fit-terminazzjoni tat-test. Nota: Bħala alternattiva għal dawk li m'għandhomx analiżi tal-immaġni, jekk il-workbench ikun sterilizzat qabel iż-żieda tal-pjanti fir-reċipjenti tat-test, riga sterili tista' tintuża wkoll biex jitkejjel it-tul tar-rimja prinċipali fil-bidu tat-test u waqt it-test. Bidliet fl-iżvilupp tal-pjanti, eż. fid-deformazzjoni tar-rimjiet, fid-dehra, fl-indikazzjoni tan-nekrozi, klorozi, fit-tkissir jew nuqqas ta' żamma fil-wiċċ u fit-tul u fid-dehra tal-għeruq, għandhom jiġu nnotati. Karatteristiċi sinifikanti tal-medium tat-test (eż. il-preżenza ta' materjal mhux mahlul, it-tkabbir tal-alka, fungi u batterji fir-reċipjent tat-test) għandhom jiġu nnotati.
37. Flimkien mad-determinazzjonijiet tat-tul tar-rimja prinċipali, l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq tlieta (jew aktar) mill-varjabbli tal-kejl li ġejjin għandhom jiġu evalwati wkoll:
- i. Tul tal-fergħat laterali totali
 - ii. Tul tar-rimja totali
 - iii. Tul tal-għeruq totali
 - iv. Piż frisk
 - v. Piż xott
 - vi. Għadd ta' sepali

▼ **M7**

Nota 1: L-osservazzjonijiet magħmula waqt it-test tas-sejbien tal-medda jistgħu jgħinu fl-ghażla tal-kejl addizzjonali rilevanti fost is-sitt varjabbli elenkati hawn fuq.

Nota 2: Id-determinazzjoni tal-pizijiet friski u xotti (parametri iv u v) hija mixtieqa ħafna.

Nota 3: Minhabba l-fatt li s-sukrosju u d-dawl (esponiment tal-għeruq għad-dawl waqt it-test) jista' jkollhom influwenza fuq it-trasportaturi tal-auxin (ormon tat-tkabbir tal-pjanti), u li ċerti sustanzi kimiċi jista' jkollhom mod ta' azzjoni tat-tip auxin, l-inkluzjoni tal-punti tat-tmiem tal-għeruq (parametru iii) hija dubjuża.

Nota 4: Ir-riżultati tar-ring test juru koeffiċjenti għoljin tal-varjazzjoni (> 60 %) għat-tul totali tal-fergħa laterali (parametru i). It-tul totali tal-fergħa laterali huwa fi kwalunkwe każ inkluz fi ħdan il-kejl tat-tul tar-rimja totali (parametru ii) li juri koeffiċjenti aktar aċċettabbli tal-varjazzjoni ta' < 30 %.

Nota 5: B'riżultat mill-kunsiderazzjonijiet preċedenti, il-punti tat-tmiem prinċipali rakkomandati huma: tul totali tar-rimja, piż frisk u niexef (parametri ii, iv u v); parametru vi — numru ta' sepali — jithalla għall-ġudizzju ta' min qed jesperimenta.

38. It-tul tar-rimja prinċipali u n-numru ta' sepali għandhom vantaġġ, fis-sens li jistgħu jkunu determinati għal kull reċipjent tat-test u tal-kontroll fil-bidu, waqt, u fl-aħħar tat-test bl-analiżi tal-fotografija u tal-immaġni, għalkemm riga (sterili) tista' tintuża wkoll.
39. Tul tal-fergħat laterali totali, tul tal-għeruq totali (bħala somma tal-fergħat jew għeruq totali kollha) u tul tar-rimja totali (bħala somma tat-tul tar-rimja prinċipali u t-tul tal-fergħat laterali totali) jistgħu jitkejlu b'riga fl-aħħar tal-esponiment.
40. Il-piż frisk u/jew niexef għandu jiġi determinat fil-bidu tat-test minn kampjun tar-rappreżentat tal-kultura ta' qabel ta' dak li se jintuża biex jinbeda t-test, fl-aħħar tat-test b'materjal tal-pjanti minn kull reċipjent tat-test u tal-kontroll.
41. It-tul tal-fergħat laterali totali, it-tul tar-rimja totali, it-tul tal-għeruq totali, il-piż frisk, il-piż niexef u n-numru ta' sepali jistgħu jiġu determinati kif ġej:
 - i. Tul tal-fergħat laterali totali: It-tul tal-fergħat laterali jista' jiġi determinat bil-kejl tal-fergħat laterali kollha b'riga fl-aħħar tal-esponiment. It-tul tal-fergħat laterali totali huwa s-somma tal-fergħat laterali kollha ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll.
 - ii. Tul tar-rimja totali: It-tul tar-rimja prinċipali jista' jiġi determinat bl-analiżi tal-immaġni jew bl-użu ta' riga. It-tul tar-rimja totali huwa s-somma tat-tul tal-fergħat laterali totali u t-tul tar-rimja prinċipali ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll fl-aħħar tal-esponiment.
 - iii. Tul tal-għeruq totali: It-tul tal-għeruq jista' jiġi determinat bil-kejl tal-għeruq kollha b'riga fl-aħħar tal-esponiment. It-tul tal-għeruq totali huwa s-somma tal-għeruq kollha ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll.
 - iv. Piż frisk: Il-piż frisk jista' jiġi determinat billi l-organizmi tat-test jintiznu fl-aħħar tal-esponiment. Il-materjal tal-pjanti ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll se jitlahlah bl-ilma distillat, ixxuttat bil-mod bil-karta ċelluloża. Wara din il-preparazzjoni, il-piż frisk se jiġi determinat billi

▼ **M7**

jintizen. Il-bijomassa tal-bidu (piż frisk) hija determinata fuq il-baži ta' kampjun tal-organizmi tat-test mehud mill-istess lott użat biex jitlaqqmu r-recipienti tat-test.

- v. Piż xott: Wara l-preparazzjonijiet għad-determinazzjoni tal-piż frisk, l-organizmi tat-test se jiġu mnixxfen f'temperatura ta' 60 °C għal piż kostanti. Din il-massa hija l-piż niexef. Il-bijomassa tal-bidu (piż niexef) hija determinata fuq il-baži ta' kampjun tal-organizmi tat-test mehud mill-istess lott użat biex jitlaqqmu r-recipienti tat-test.

- vi. Għadd ta' sepali: Is-sepali kollha se jingħaddu tul ir-rimja prinċipali.

Frekwenza tal-kejl u determinazzjonijiet analitiċi

42. Jekk jintuża disinn ta' test statiku, għandu jitkejjel il-pH ta' kull trattament fil-bidu u fi tmiem it-test. Jekk jintuża disinn tat-test semistatiku, il-pH għandu jitkejjel f'kull lott ta' soluzzjoni tat-test "għdid" qabel kull tiġdid u anki fis-soluzzjonijiet korrispondenti "użati"
43. L-intensità tad-dawl għandha titkejjel fil-kamra tat-tkabbir, fl-inkubatur jew fi kmamar f'punti fl-istess distanza mis-sors tad-dawl b'hall-organizmi tat-test. Il-kejl għandhom isiru tal-inqas darba matul it-test. It-temperatura tal-medium fil-kontenitur sostitwit miżmum fl-istess kundizzjonijiet tal-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra għandhom jiġu rreġistrati mill-inqas darba kuljum (jew kontinwament b'logger tad-dejta).
44. Waqt it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa. F'testijiet statiki, ir-rekwizit minimu huwa li jiġu ddeterminati l-konċentrazzjonijiet fil-bidu u fi tmiem it-test.
45. F'testijiet semistatiki fejn il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) mhumiex mistennija li jibqgħu fi hdan $1 \pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni nominali, huwa mehtieg li jiġu analizzati s-soluzzjonijiet tat-test ippreparati friski u l-istess soluzzjonijiet f'kull tiġdid. Madankollu, għal daww it-testijiet fejn il-konċentrazzjonijiet inizjali mkejla tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) tat-test mhumiex fi hdan $1 \pm 20\%$ tan-nominali iżda fejn tista' tiġi pprovduta evidenza suffiċjenti biex turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (jiġifieri fi hdan il-medda ta' 80 — 120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitwettqu biss fuq l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tat-test qabel it-tiġdid għandhom biss isiru fuq recipient replikat wiehied f'kull konċentrazzjoni tat-test (jew il-kontenut tar-recipienti migbura skont ir-replika).
46. Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tat-test inżammet b'mod sodisfacenti fi hdan $1 \pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, l-analiżi tar-riżultati tista' tkun ibbażata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla. Jekk id-devjazzjoni mill-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla mhix fi hdan $1 \pm 20\%$, l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja geometrika waqt l-esponiment jew mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (5).

Test tal-limitu

47. Taht ċertu ċirkostanzi, eż. meta test preliminari jindika li s-sustanza kimika tat-test m'għandha l-ebda effett tossiku f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu tas-solubilità tagħha fil-medium tat-test jew fil-każ ta' formulazzjoni sal-limitu tad-dispersibbiltà, jista' jsir test tal-limitu li jinvolvi paragun tar-risposti fi grupp tal-kontroll u fi grupp tat-trattament wiehied (100 mg/l jew konċentrazzjoni uguali għal-limitu tas-solubilità). Huwa rrakkomandat

▼ **M7**

ħafna li dan ikun appoġġjat bl-analiżi tal-konċentrazzjoni tal-esponiment. Japplikaw il-kundizzjonijiet tat-test u l-kriterji ta' validità deskritti preċeden-temment kollha għal test tal-limitu, bl-eċċezzjoni li n-numru ta' repliki tat-trattament għandu jiġi dduplikati. It-tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-media, eż. Test-t ta' Student.

DATA U RAPPORTAR**Varjabbli ta' rispons**

48. L-iskop tat-test huwa li jiddetermina l-effetti ta' sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv tal-*Myriophyllum spicatum*. Dan il-metodu ta' ttestjar jiddeskrivi żewġ varjabbli tar-rispons.

a) Rata ta' tkabbir speċifika medja: Dan il-varjabbli tar-rispons huwa kkalkulat fuq il-bażi ta' tibdil fil-logaritmi tat-tul tar-rimja prinċipali, u barra minn hekk, fuq il-bażi ta' tibdil fil-logaritmi ta' parametru tal-kejl oħrajn, jiġifieri it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali matul iż-żmien (espressi bħala granet) fil-kontrolli u f'kull grupp tat-trattament. Nota: Għall-parametru tal-kejl it-tul tal-ferġat laterali totali u t-tul tal-għerq totali, mhux possibbli kalkolu tar-rata medja speċifika tat-tkabbir. Fil-bidu tat-test, l-organizmu tat-test m'għandu l-ebda ferġa laterali u l-ebda għerq (abbazi tal-preparazzjoni mill-kultura ta' qabel); meta tibda mill-valur żero, il-kalkolu tar-rata tat-tkabbir speċifika medja mhux definit.

b) Rendiment: Dan il-varjabbli tar-rispons huwa kkalkulat fuq il-bażi ta' tibdil fit-tul tar-rimja prinċipali, u barra minn hekk, fuq il-bażi ta' tibdil f'parametri tal-kejl oħra — jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali, u parametri oħra jekk jitqiesu utli — fil-kontrolli u f'kull grupp tat-trattament sal-aħħar tat-test.

49. Stimuli tat-tossicità għandhom ikunu bbażati fuq it-tul tar-rimja prinċipali u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef, in-numru ta' sepali, ara l-paragrafu 37 u n-Noti 2, 4 u 5 ta' dan il-paragrafu), minhabba li ċertu sustanzi kimiċi jaffettwaw varjabbli oħra tal-kejl ħafna aktar mit-tul tar-rimja prinċipali. Dan l-effett ma jiġix rivelat bil-kalkolu tat-tul tar-rimja biss.

Rata ta' tkabbir speċifika medja

50. Ir-rata tat-tkabbir speċifiku medju għal perjodu speċifiku hija kkalkulata bħala ż-żieda logaritmika fil-varjabbli tat-tkabbir — tul tar-rimja prinċipali u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru tas-sepali) — bl-użu tal-formula t'hawn taħt għal kull replikazzjoni tal-kontroll u t-trattamenti:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

fejn:

μ_{i-j} : rata ta' tkabbir speċifika medja mill-hin i sa j

N_i : varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'hin i

N_j : varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'hin j

t: perjodu ta' hin minn i sa j

▼ **M7**

Għal kull grupp ta' trattament u kull grupp ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza.

51. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għandha tiġi kkalkolata għall-perjodu ta' ttestjar kollu (il-hin "i" fil-formola ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-hin "j" huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir speċifika medja flimkien mal-istimi tal-varjanza. Barra minn hekk, għandha tiġi vvalutata r-rata ta' tkabbir skont is-sezzjoni sabiex jiġu evalwati l-effetti tas-sustanza kimika tat-test li jsehhu matul il-perjodu ta' esponiment (eż.. billi jiġu spezzjonati l-kurvi ta' tkabbir ittrasformati mil-log).
52. Perċentwal ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formula li ġejja:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

fejn:

% I_r : perċentwal ta' inibizzjoni frata medja ta' tkabbir speċifiku

μ_C : valur medju għal μ fil-kontroll

μ_T : valur medju għal μ fil-grupp tat-trattament

Rendimento

53. Effetti fuq ir-rendiment huma determinati fuq il-bażi tat-tul tar-rimja principali tal-varjabbli tal-kejl u tliet varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru tas-sepali) preżenti f'kull reċipjent tat-test fil-bidu u fl-aħħar tat-test. Għall-piż frisk jew piż niexef, il-bijomassa tal-bidu hija determinata fuq il-bażi ta' kampjun tal-organizmi tat-test meħud mill-istess lott użat biex jitlaqqmu r-reċipjenti tat-test. Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkula valur medju għar-rendiment flimkien mal-istimi tal-varjanza. Il-perċentwal medju fir-rendiment (% I_y) jista' jiġi kkalkulat għal kull grupp tat-trattament kif ġej:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

fejn:

% I_y : tnaqqis perċentwali fir-rendiment

b_C : bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll

b_T : bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

Hin għall-irdoppjar

54. Biex jiġi ddeterminat il-hin tal-irdoppjar (T_d) tat-tul tar-rimja principali u l-aderenza għal dan il-kriterju tal-validità (ara l-paragrafu 8), il-formula li ġejja hija użata bid-dejta miksuba mir-reċipjenti tal-kontroll:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

Fejn μ hija r-rata speċifika tat-tkabbir medja determinata kif deskritt fil-paragrafi 50-52.

▼ **M7****Ipplottjar tal-kurvi konċentrazzjoni-rispons**

55. Il-kurvi tal-konċentrazzjoni-rispons li għandhom x'jaqsmu mal-inibizzjoni tal-perċentwal medju tal-varjabbli tar-rispons (I_r , jew I_y ikkalkulat kif jidher fil-paragrafu 53) u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu pplottjati.

Stimi tal- EC_x

56. Stimi tal- EC_x għandhom ikunu bbażati kemm fuq ir-rata speċifika tat-tkabbir medja (E_rC_x) kif ukoll ir-rendiment (E_yC_x), li kull wiehied minnhom għandu mbagħad ikun ibbażat fuq it-tul tar-rimja prinċipali, u possibbilment varjabbli tal-kejl addizzjonali (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru tas-sepali). Dan minhabba li hemm sustanzi kimiċi li jagħmlu impatt fuq it-tul tar-rimja prinċipali u varjabbli tal-kejl oħrajn b'mod differenti. Il-parametri ta' tossiċità mixtieqa huma għalhekk erba' valuri EC_x għal kull livell ta' inibizzjoni kkalkulat: E_rC_x (tul tar-rimja prinċipali); E_rC_x (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef, jew in-numru tas-sepali); E_yC_x (tul tar-rimja prinċipali); E_yC_x (jiġifieri preferibbilment it-tul tar-rimja totali, il-piż frisk, il-piż niexef, jew in-numru tas-sepali);
57. Għandu jiġi nnotat li l-valuri EC_x ikkalkulati bl-użu ta' dawn il-varjabbli tar-rispons mhumiex komparabbli u din id-differenza hija rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq ir-rata tat-tkabbir speċifika medja (E_rC) fil-maġġoranza tal-każi se jkunu oghla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) — jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-metodu ta' ttestjar huma osservati — minhabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Din id-differenza m'għandhiex tkun interpretata bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli tar-rispons, iżda sempliċiment li l-valuri huma differenti matematikament.

Proċeduri ta' statistika

58. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analizi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ponderata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-data dwar ir-rispons — eż. ma' modelli probit jew logit jew Weibull (7), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmaniġġjaw aħjar irregolaritajiet inevitabbli fid-dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet uniformi. Meta jkunu viċin iż-zero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistgħu jtkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analizi (7). Għandu jiġi nnotat li l-metodi standard tal-analizi li jużaw it-trasformazzjonijiet probit, logit jew Weibull huma maħsuba għall-użu fuq id-data kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u għandhom jiġu modifikati biex jakkomodaw ir-rata tat-tkabbir jew irendu d-dejta. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni tal-valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinsabu f(8) (9) (10).
59. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x . Fejn ikun possibbli, għandhom jiġu stmati l-limiti ta' kunfidenza ta' 95 % għal kull stima. It-tjubija tad-dwar ir-rispons tad-dejta għall-mudell ta' rigressjoni għandha tiġi vvalutata grafikament jew statistikament. L-analizi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament.
60. Stimi EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (10), jekk il-mudelli/metodi ta' regressjoni aċċessibli m'humiex xierqa għad-dejta.
61. Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa mehtieg li jitqabblu l-medji ta' trattament permezz ta' analizi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni mbagħad titqabbel mal-medja tal-kontroll bl-użu ta' metodu ta' ttestjar ta' paragun multipli jew tax-xejriet xieraq. It-testijiet Dunnett jew Williams jistgħu jkunu utli (12) (13) (14) (15) (16). Huwa mehtieg li jiġi vvalutat jekk treggix is-suppożizzjoni tal-omoġeneità ta'

▼ **M7**

varjanza ta' ANOVA. Din il-valutazzjoni tista' titwettaq grafikament jew b'test formali (15). Testijiet xierqa huma Levene jew Bartlett. Jekk is-suppożizzjoni ta' omogeneità tal-varjanzi ma tkunx issodisfata, din kultant tista' tigi kkoreġuta bi trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eterogeneità tal-varjanza hija estrema u ma tistax tigi kkoreġuta bi trasformazzjoni, għandha tigi kkunsidrata analizi b'metodi bħat-test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere. F'(10) tista' tinstab gwida addizzjonali dwar id-determinazzjoni tal-NOEC.

62. Żviluppi xjentifiċi riċenti wasslu għal rakkomandazzjoni biex jiġi abbandunat il-kunċett tal-NOEC u minflok jinbidel bi stimuli EC_x ta' punti bbazati fuq regressjoni. Ma ġiex stabbilit valur xieraq għal x għal dan it-test *Myriophyllum*. Madankollu, firxa ta' 10 sa 20 % tidher xierqa (jiddependi fuq il-varjabbli tar-rispons magħżul), u preferibbilment kemm l- EC_{10} u l- EC_{20} u l-limiti tal-kunfidenza tagħhom għandhom jiġu rappurtati.

Ir-rapportar

63. Ir-rapport tat-test jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test

Sustanza monokostitwenti:

- dehra fiżika, solubbiltà fl-ilma, u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impurità jiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

Sustanza multikostitwenti, UVCBs jew taħlita:

- karatterizzati kemm jista' jkun bl-identità kimika (ara hawn fuq), okkorrenza kwantitattiva u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test

- L-isem xjentifiku u s-sors.

Kundizzjonijiet tat-test

- Il-proċedura tat-test użata (statika jew semistatika).
- Id-data tal-bidu tat-test u d-durata tiegħu.
- Medium tat-test
- Deskrizzjoni tad-disinn sperimentali: reċipjenti u għotjien tat-test, volumi tas-soluzzjoni, it-tul tar-rimja prinċipali għal kull reċipjent tat-test fil-bidu tat-test.
- Il-konċentrazzjonijiet tat-test (nominali u mkejla kif xierqa) u n-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni.
- Metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u tat-test inkluż l-użu ta' kwalunkwe solvent jew agent dispersiv.
- It-temperatura matul it-test.
- Is-sors tad-dawl, l-intensità tad-dawl u l-omoġenità.
- Il-valuri tal-pH tal-media tat-test u ta' kontroll.
- Il-metodu tal-analizi tas-sustanza kimika tat-test bid-dejta tal-valutazzjoni ta' kwalità xierqa (studji tal-validazzjoni, devjazzjonijiet standard jew limiti tal-kunfidenza ta' analizijiet).

▼ **M7**

- Metodi għad-determinazzjoni tat-tul tar-rimja prinċipali u varjabbli tal-kejl ohrajn, eż. tul tal-fergħat laterali totali, tul tar-rimja totali, tul tal-għerquq totali, piż frisk, piż niexef jew numru tas-sepali.
- L-istat tal-kultura (sterili jew mhux sterili) ta' kull reċipjent tat-test u tal-kontroll f'kull osservazzjoni.
- Id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-metodu ta' ttestjar.

Riżultati

- Dejta mhux ipproċessata: tul tar-rimja prinċipali u varjabbli tal-kejl ohrajn f'kull reċipjent tat-test u tal-kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni tal-analizi.
- Medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;
- Kurvi tat-tkabbir għal kull varjabbli tal-kejl.
- Il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki.
- Rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett.
- Stimuli ta' punti ta' tmiem tossiċi għal varjabbli ta' rispons eż. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikunu kkalkolati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom.
- Jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza l-inqas sinifikanti).
- Kwalunkwe stimulazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament.
- Kwalunkwe sinjal viżiva tal-fitotossicità kif ukoll l-osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test.
- Diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

TAGHRIF

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
- (2) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
- (3) Il-Kapitolu C.26 ta' dan l-Anness: *Lemna sp. Test tal-Inibizzjoni mit-Tkabbir*.
- (4) OECD (2014), “*Myriophyllum spicatum* Test tat-Tossiċità: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system” OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Serje dwar l-Ittestjar u l-Evalwazzjoni, Nru 205, Pubblikazzjoni OECD, Paris.
- (5) OECD (2000), “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures” OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (6) Il-Kapitolu C.51 ta' dan l-Anness: Water-Sediment *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test

▼ **M7**

- (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
- (8) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
- (10) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
- (12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
- (16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼ **M7***Appendiċi 1***DEFINIZZJONIJIET**

Bijomassa hija l-piż frisk u/jew niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test il-bijomassa hija s-somma tar-rimja prinċipali, tal-fergħat laterali kollha u tal-għerūq kollha.

Sustanza kimika hija sustanza jew tahlita.

Klorożi hija l-bidla tal-kulur minn aħdar għal sfurija tal-organizmu tat-test speċjalment tas-sepali.

EC_x huwa l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mahlula fil-medium tat-test li jirriżulta fi tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir tal-*Myriophyllum spicatum* f'perjodu ta' esponiment ddikjarat (li għandu jissewma esplicitament jekk iwarja mid-durata tat-test shiħ jew normali). Biex tindika mingħajr ambigwità valur EC li jiġi derivat minn rata tat-tkabbir, is-simbolu "E_rC" jintuza għar-rata tat-tkabbir u "E_yC" jintuza għar-rendiment, segwit mill-varjabbli tal-kejl użat, eż. E_rC (tul tar-rimja prinċipali).

It-tkabbir huwa zieda fil-varjabbli tal-kejl, eż. tul tar-rimja prinċipali, l-ammont tal-fergħat laterali totali, it-tul tar-rimja totali, it-tul tal-għerūq totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali matul il-perjodu tat-test.

Ir-rata tat-tkabbir (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija ż-zieda logaritmika fil-varjabbli tal-kejl waqt il-perjodu tal-esponiment. *Nota:* Il-varjabbli tar-rispons relatati mar-rata tat-tkabbir huma indipendenti mid-durata tat-test sakemm il-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi tal-kontroll mhux esposti huwa esponenzjali.

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir ($b'p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'hin ta' esponiment partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha oghla mil-LOEC għandu jkollhom effett ta' ħsara ugwali jew oghla minn dawk osservati fil-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jistgħux jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni dettaljata għal kif il-LOEC (u b'hekk in-NOEC) intgħazlet.

Varjabbli tal-kejl huma kwalunkwe tip ta' varjabbli li huma mkejla biex jesprimu l-punt tat-tmiem tat-test bl-użu ta' wieħed jew aktar varjabbli tar-rispons differenti. F'dan il-metodu ta' ttestjar it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-fergħat laterali totali; it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-għerūq totali, il-piż frisk, il-piż xott u n-numru ta' sepali huma varjabbli tal-kejl.

Monokultura hija kultura bi speċi ta' pjanta waħda.

Nekrożi huwa tessut mejjet (jiġifieri abjad jew kannella skur) tal-organizmu tat-test.

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taħt l-LOEC.

Varjabbli tar-rispons huwa varjabbli għall-istima tat-tossicità derivata minn kwalunkwe varjabbli mkejja li jiddeskrivi l-bijomassa b'metodi differenti tal-kalkolu. Għal dan il-metodu ta' ttestjar, ir-rata tat-tkabbir u r-rendiment huma varjabbli tar-rispons derivati minn varjabbli tal-kejl bħat-tul tar-rimja prinċipali, tul tar-rimja totali, piż frisk, piż niexef jew numru ta' sepali.

Test semistatiku (tiġdid) huwa test fejn is-soluzzjoni tat-test tiġi sostitwita perijodikament f'intervalli speċifiċi matul it-test.

▼ M7

Test statiku huwa metodu ta' ttestjar minghajr tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew tahlita li tiġi ttestjata billi jintuza dan il-metodu ta' ttestjar

Punt ta' tmiem tat-test jiddeskrivi l-fattur generali li jinbidel b'mod relattiv għall-kontroll mis-sustanza kimika tat-test bħala mira tat-test. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-punt ta' tmiem tal-ittestjar hija l-inibizzjoni li tista' tiġi espressa b'varjabbli ta' rispons differenti li huma bbażati fuq varjabbli ta' kejl wiehed jew iktar.

Medium tat-test huwa medium ta' tkabbir sintetiku komplut li fuqu jikbru l-pjanti tal-ittestjar meta esposti għas-sustanza kimika tat-test. Is-sustanza kimika tat-test tinhall fil-medium tat-test.

UVCB hija sustanza ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodott ta' reazzjoni kumplessa jew materjal bijoloġiku

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex tiġi espressa l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' esponiment li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' esponiment. Nota: Meta l-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi mhux esposti huwa esponenzjali, il-varjabbli tar-rispons ibbażati fuq ir-rendiment se jonqsu matul id-durata tat-test.

▼ **M7***Appendiċi 2***ANDREWS MODIFIKAT GHALL-KULTURA TAL-HAŻNA U TA' QABEL IL-HAŻNA**

Minn hames soluzzjonijiet tal-hażna tan-nutrijent ippreparati separatament il-medium Andrews modifikat għall-kultura tal-hażna u l-kultura ta' qabel il-hażna se jiġi ppreparat, biż-żieda ta' 3 % sukrożju.

*Tabella 1***Kompożizzjoni tas-soluzzjoni tan-nutrijent Andrews: (Deżinjazzjoni ASTM E 1913-04)**

Il-produzzjoni ta' soluzzjonijiet tal-hażna tan-nutrijent			Il-produzzjoni ta' soluzzjoni tan-nutrijent
Soluzzjoni tal-hażna	Sustanza Kimika	Piż inizjali għal kull 1000 ml	ml għal kull 5 l soluzzjoni tan-nutrijent
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	Ara hawn taht soluzzjoni tal-hażna 3.1		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	0,372 g	

Is-soluzzjonijiet tal-hażna jistgħu jinżammu fi friġġ għal 6 xhur (f'temperatura ta' 5-10 °C). Hija biss is-soluzzjoni tal-hażna Nru. 5 li għandha hajja fuq l-ixkaffa mnaqqsa (xahrejn).

*Tabella 2***Produzzjoni tas-soluzzjoni tal-hażna 3.1 għall-preparazzjoni tas-soluzzjoni tal-hażna 3**

Sustanza Kimika	Piż inizjali ta' g/100 ml
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,0037

Wara li tipproduċi s-soluzzjoni tal-hażna 3,1 (Tabella 2), iffriża malajr din is-soluzzjoni fi 11 ml alikwoti (f'temperatura ta' – 18 °C mill-inqas). Il-porzjonijiet iffriżati malajr għandhom żmien tal-ħżin ta' hames snin.

Biex tipproduċi soluzzjoni tal-hażna 3, nehhi mill-friża s-soluzzjoni tal-hażna 3,1, ilma 10 ml minnu fi flixxun volumetrik ta' 1 l u zid ilma pur hafna sal-marka tal-flixxun.

Biex tikseb medium Andrews modifikat, imla madwar 2 500 ml ilma pur hafna ġo flixxun volumetrik 5 l. Wara li żżid 50 ml ta' kull soluzzjoni tal-hażna, imla 90 % tal-flixxun volumetrik b'ilma pur hafna u taġġusta l-pH għal 5,8.

▼M7

Wara dan, žid 150 g sukrożju mahlul (3 % għal kull 5 l); imbagħad, žid il-flixxun volumetriku b'ilma pur hafna sal-marka. Finalment, is-soluzzjoni tan-nutrijent timtela fil-fliexken Schott ta' 1 l u maqsuma f'temperatura ta' 121 °C għal 20 minuta.

Is-soluzzjoni tan-nutrijenti prodotta tista' tinzamm sterili fi frigg (f'temperatura ta' 5-10 °C) għal tliet xhur.

Medium Andrews modifikat għal test tat-tossicità hieles mis-Sediment

Mis-soluzzjonijiet tal-hażna ta' hames nutrijenti diġà msemmija fit-Tabelli 1 u 2, medium Andrews modifikat ikkonċentrat għal għaxar darbiet mehtieg biex jinkisbu s-soluzzjonijiet tat-test se jkunu ppreparati, biż-żieda ta' 30 % sukrożju. Biex tagħmel dan, imla madwar 100 ml ilma pur hafna go flixxun volumetriku 1 l. Wara li żżid 100 ml ta' kull wiehed mis-soluzzjonijiet tal-hażna, aġġusta l-pH għal 5,8. Wara dan, žid 30 % tas-sukrożju mahlul (300 g għal kull 1 000 ml); imbagħad, žid il-flixxun volumetriku b'ilma pur hafna sal-marka.

Finalment, is-soluzzjoni tan-nutrijent timtela fil-fliexken Schott ta' 0,5 l u maqsuma f'temperatura ta' 121 °C għal 20 minuta.

Is-soluzzjoni tan-nutrijenti konċentrata għal għaxar darbiet prodotta tista' tinzamm sterili fi frigg (f'temperatura ta' 5-10 °C) għal tliet xhur.

▼ M7

Appendiċi 3

ŻAMMA TAL-KULTURA TAL-HAŻNA

F'din l-Appendiċi 3, il-kultura tal-ħażna *Myriophyllum spicatum* L.⁽¹⁾, dikotiledonu akwatiku mgħarraq, hija deskritta speċi tal-ħaxixa tal-morliti tal-ilma. Bejn Ġunju u Awwissu, fjuri roża-bojod mōħbija jisporgu minn fuq il-wieċ tal-ilma. Il-pjanti huma mizrugħin fl-art permezz ta' sistema ta' riżomi robusti u jistgħu jinstabu fl-emisfera tat-tramuntana kollha f'ilmijiet kalmi ewtrofiċi, iżda mhux imniġġsa u aktar kalċiferi b'sottostrat tat-tajn. Il-*Myriophyllum spicatum* jippreferi l-ilma frisk, iżda jinsab fl-ilma salmastru wkoll.

Għall-kultura tal-ħażna ħielsa mis-sediment taht kundizzjonijiet tal-laboratorju, huma meħtieġa pjanti sterili. Pjanti sterili huma disponibbli mil-laboratorju tal-ekotossikoloġija tal-Umweltbundesamt Germaniz (Aġenzija Federali Ambjentali tal-Germanja).

Inkella, l-organizmi tat-test jistgħu jiġu ppreparati minn pjanti mhux sterili skont id-dezinjazzjoni ASTM E 1913-04. Ara hawn taht — estratt mill-Gwida Standard ASTM — il-proċedura għall-ikkulturar tal-*Myriophyllum sibiricum* miġbur mill-post:

“Jekk tibda mill-post fejn miġbura, pjanti mhux sterili, iġbor il-blanzuni tal-*M. sibiricum* fil-harifa. Poġġi l-blanzuni f'akwarju ta' 20 l li fih 5 cm sediment sterili li huwa mgħotti bir-ramel silica jew pereżempju bit-Turface® u 18 l ta' ilma reaġent. Qalleb l-akwarju u żomm f'temperatura ta' 15 °C u rata tal-fluenza ta' 200 sa 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ għal 16-il siegħa fil-ġurnata. Il-kultura tal-pjanti fl-akwarju tista' tinżamm bħala sors ta' riżerva ta' pjanti fil-każ li l-kulturi tal-pjanti sterili jinqerdu b'malfunzjoni mekkanika fil-kabinett tat-tkabbir, bil-kontaminazzjoni jew xi raġuni oħra. Il-pjanti mkabbra fl-akwarju mhumex sterili u kulturi sterili ma jistgħux jinżammu f'sistema tal-kultura tal-lott. Biex tiġi sterilizzata l-kultura, il-pjanti jitneħħew mill-akwarju u jitlahalhu taht ilma ġieri dejonizzat għal madwar nofs siegħa. Taht kundizzjonijiet asettici f'kabinett tal-arja laminari, il-pjanti huma diżinfettati għal inqas minn 20 minuta (sakemm il-maġġoranza tat-tessut tal-pjanta jiġi bblieċat u l-apieċi li qed tikber tibqa' hadra) f'soluzzjoni ta' 3 % (w/v) tas-sodju ipokloritu li fiha 0,01 % tal-aġent tensjoattiv xieraq. Hawwad id-diżinfettant u l-materjal tal-pjanti. Segmenti b'diversi nodi huma trasferiti f'tubi tal-kulturi sterili li fihom 45 ml medium Andrews sterilizzat u modifikat u magħluqa b'għeluq tat-tubu tal-kultura sempliċi. Segment tal-pjanti wiehed biss jitpoġġa f'kull kompartment tat-test. Film tal-issigħill tal-laboratorju jintuża biex jiżgura l-għeluq lir-riċipjent tal-kultura. Ladarba tkun giet stabbilita kultura sterili, is-segmenti tal-pjanti li fihom bosta nodi għandhom jiġu ttrasferiti fil-kompartimenti tat-test godda li jkun fihom midja tan-nutrijenti likwida friska kull għaxar sa tnax-il ġurnata. Kif muri bl-ikkulturar fuq il-plates tal-agar, il-pjanti għandhom ikunu sterili u jibqgħu sterili għal tmien ġimgħat qabel jista' jinbeda l-ittestjar.”

Peress li l-medium Andrews modifikat fih is-sukrożju (li jstimula t-tkabbir tal-fungi u tal-batterji), il-materjali, soluzzjonijiet u l-ikkulturar kollha għandhom isiru taht kundizzjonijiet sterili. Il-likwidi kollha kif ukoll it-tagħmir huma sterilizzati qabel l-użu. L-sterilizzazzjoni ssir permezz ta' trattament tal-arja msahħna (210 °C) għal 4 siegħat jew awtoklava għal 20 minuta f'121 °C. Barra minn hekk, il-flasks, dixxijiet, skutelli, eċċ. kollha u tagħmir ieħor jgħaddu minn trattament tal-fjamma fuq workbench sterili eżatt qabel l-użu.

Kulturi tal-ħażna jistgħu jinżammu taht illuminazzjoni u temperatura mnaqq-sa $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 ± 2 °C) għal hinijiet itwal mingħajr il-bżonn li jerrgħu jiġu stabbiliti. Il-medium tat-tkabbir *Myriophyllum* għandu jkun l-istess bħal dak użat għall-ittestjar iżda midja oħra rikka fin-nutrijenti tista' tintuża għall-kulturi tal-ħażna.

⁽¹⁾ Carl von Linné (* it-23 ta' Mejju 1707 f' Råshult /Älmhult; † l-10 ta' Jannar 1778 f' Uppsala).

▼ **M7**

Is-segmenti tal-pjanti huma distribwiti assenikament f'diversi fliekkien tal-500 ml Erlenmeyer u/jew 2 000 ml Fernbach, kull wiehed mimli b'madwar 450 u rispettivament 1 000 ml medium Andrews modifikat. Imbagħad, il-fliekkien isirilhom plagg bit-tapp assenikament ċellulożi.

Barra minn hekk, it-trattament bil-fjamma ta' tagħmir fil-workbench sterili eżatt qabel l-użu huwa assolutament neċessarju. Skont in-numru u d-daqs, il-pjanti għandhom jiġu trasferiti fis-soluzzjoni tan-nutrijent friska madwar kull tliet ġimgħat.

Jistgħu jintużaw apici kif ukoll segmenti tal-parti tan-nofs taz-zokk għal din il-kultura mġedda. In-numru u d-daqs tal-pjanti trasferiti (jew tas-segmenti tal-pjanti) jiddependi fuq kemm huma meħtieġa pjanti. Pereżempju, tista' tittrasferixxi hames segmenti tar-rimja fi fliekkun Fernbach wiehed u tliet segmenti tar-rimja fi fliekkun Erlenmeyer wiehed, kull waħda b'tul ta' 5 cm. Armi kwalunkwe partijiet bl-għeruq, bil-fjuri, mejta jew li jkunu evidenti b'xi mod jew iehor.

Figura 1

Il-qtugħ tal-pjanti għall-hażna u l-kultura ta' qabel wara 3 ġimgħat tal-kultivazzjoni.



Il-kultura tal-pjanti għandha titwettaq fi fliekkien tal-500 ml Erlenmeyer u fil-fliekkien tal-2 000 ml Fernbach f'inkubatur li jkessah f'temperatura ta' 20 ± 2 °C b'dawl kontinwu f'madwar $100-150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ jew 6 000-9 000 Lux (emess minn illuminazzjoni tal-kompartiment bil-kulur tat-temperatura "dawl abjad baxx").

Figura 2

Il-kultura tal-pjanti f'inkubatur li jkessah b'kompartiment tal-illuminazzjoni.



Għandhom jintużaw reċipjenti tal-kulturi tal-ħġieġ kimikament nodfa (maħsula bl-aċidu) u sterilizzati kif ukoll tekniki ta' mmannigġar aseptiċi. Fil-każ ta' kontaminazzjoni tal-kultura tal-hażna eż. bl-alka, fungi u/jew batterji, kultura ġdida għandha tiġi ppreparata jew kultura tal-hażna minn laboratorju għandha tintuża biex tiġġedded waħda mill-kulturi.

▼ **M7**

Appendiċi 4

MANUTENZJONI TAL-KULTURA TA' QABEL U PREPARAZZJONI TAL-ORGANIŻMU TAT-TEST GHALL-ITTESTJAR

Biex tikseb kultura ta' qabel, aqta r-rimjiet mill-kultura tal-hażna f'segmenti b'żewġ sepali kull wieħed; poġġi s-segmenti fil-fliexken Fernbach mimlija b'medium Andrews modifikat (bi 3 % sukrożju). Kull fliexkun jista' jkollu sa 50 segment tar-rimja. Madankollu, għandha tinghata attenzjoni li s-segmenti huma vitali u m'għandhom l-ebda gheruq u ferġat laterali fuq il-blanzuni (ara l-figura 1 fl-Appendiċi 3).

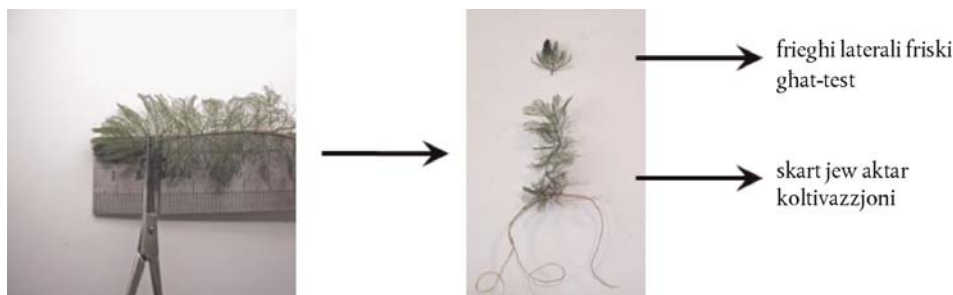
L-organizmi tal-kultura ta' qabel huma kkulturati għal 14 sa 21 ġurnata taht kundizzjonijiet sterili f'kompartiment ambjentali b'fażijiet li jalternaw id-dawl/dlam ta' 16/8 sigħat. Intensità tad-dawl magħżula mill-firxa ta 100-150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test għandha tkun ta' 23 ± 2 °C.

Peress li l-medium Andrews modifikat fih is-sukrożju (li jstimula t-tkabbir tal-fungi u l-batterji), għandhom jiġu ppreparati soluzzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test u l-ikkulturar għandu jsir taht kundizzjonijiet sterili. Il-likwidi kollha kif ukoll it-tagħmir huma sterilizzati qabel l-użu. L-isterilizzazzjoni ssir permezz ta' trattament tal-arja msahħna (210 °C) għal 4 sigħat jew awtoklava għal 20 minuta f'121 °C. Barra minn hekk, il-flasks, dixxijiet, skutelli, eċċ. kollha u tagħmir ieħor jgħaddu minn trattament tal-fjamma fuq workbench sterili eżatt qabel l-użu.

Rimjiet huma mnehhija b'mod asseniku mill-fliexkien tal-kultura ta' qabel, bl-għażla ta' materjal li huwa omoġenju kemm jista' jkun. Kull test jehtieg mill-inqas 60 organizzmu tat-test (l-ittestjar bi tmien konċentrazzjonijiet kimiċi tat-test). Għall-ittestjar, aqbad friegħi laterali friski minn kulturi ta' qabel, qassarhom għal 2,5 cm mill-bażi (bl-użu ta' riga) u ttrasferihom għal beaker li fih medium Andrews modifikat sterili. Dawn il-friegħi laterali friski jistgħu jintużaw għat-test tat-tossiċità hieles mis-sediment *Myriophyllum spicatum*.

Figura 2

Qtugħ tal-pjanti minn pre-kultura għat-test tat-tossiċità hieles mis-sediment *Myriophyllum spicatum*.



▼ M7

C.51. MYRIOPHYLLUM SPICATUM TAS-SEDIMENT TAL-ILMA

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa ekwivalenti għal-linji gwida tat-test tal-OECD 239 (2014). Metodi tat-test huma disponibbli għall-pjanta li tibqa' f'wiċċ l-ilma, monokotiledonja akwatika, *Lemna* speċi (1) u għall-alka speċi (2). Dawn il-metodi normalment jintużaw biex jiġġeneraw dejta biex jindirizzaw ir-riskju tas-sustanzi kimiċi tat-test, b'mod partikolari sustanzi kimiċi b'attività erbiċidali, għal speċi ta' pjanti akwatiċi mhux fil-mira. Madankollu, f'ċertu każijiet, tista' tkun meħtieġa dejta għal speċi makrofiti addizzjonali. Gwida riċenti ppubblikata mill-workshop tas-Socjetà għat-Tossikologija u l-Kimika Ambjentali (SETAC) dwar il-Valutazzjoni tar-Riskju tal-Makrofiti Akwatiċi għall-Pesticidi (AMRAP) ipproponiet li d-dejta għal speċi makrofiti tal-għeruq jistgħu jkunu meħtieġa għas-sustanzi kimiċi tat-test fejn il-*Lemna* u l-alki huma magħrufa li ma jkunux sensittivi għall-mod ta' azzjoni jew jekk il-qsim tas-sediment huwa ta' thassib, iwassal għal esponiment permezz tal-assorbiment tal-għeruq (3). Abbazi tal-għarfien u l-esperjenza attwali, *Myriophyllum* spp intgħazlu bħala l-ispeċi ppreferuta f'każijiet fejn id-dejta hija meħtieġa għal speċi ta' taht l-ilma, dikotiledoni bl-għeruq (4) (5) (6). Dan it-test ma jissostitwixxi testijiet tat-tossicità akwatika oħrajn; minflok dan għandu jikkumplementahom sabiex tkun tista' ssir valutazzjoni aktar kompleta tal-periklu akwatiku tal-pjanti u tar-riskju. Il-metodu ta' ttestjar tas-sediment tal-ilma *Myriophyllum spicatum* jikkumplementa t-Test tat-Tossicità tas-sediment tal-ilma *Myriophyllum spicatum* (7).
2. Dan id-dokument jiddeskrivi metodu ta' ttestjar, li jippermetti evalwazzjoni tal-effetti ta' ssustanza kimika tat-test fuq l-ispeċi tal-pjanta akwatika bl-għeruq *Myriophyllum spicatum*, li tikber f'sistema tas-sediment tal-ilma. Dan il-metodu ta' ttestjar huwa bbażat parzjalment fuq il-metodi eżistenti (1) (2) (8) u jqis ir-riċerka riċenti relatata mal-valutazzjoni tar-riskju tal-pjanti akwatiċi (3). Il-metodu tas-sediment tal-ilma ġie vvalidat minn ring test internazzjonali li twettaq bl-ispeċijiet *Myriophyllum* li tkabbret f'kundizzjonijiet statiči, li ġew esposti għas-sustanza kimika tat-test permezz ta' applikkazzjonijiet magħmula permezz tal-kolonna tal-ilma (9). Madankollu, is-sistema tat-test hija faċilment adattata biex tippermetti għal esponiment permezz tas-sediment modifikat jew esponiment permezz tal-faġi tal-ila f'xenarji semistatichi jew bid-doża pulsata, għalkemm dawn ix-xenarji ma ġewx formalment ittestjati. Barra minn hekk, il-metodu ġenerali jista' jintuża għal speċijiet oħrajn bl-għeruq, mgħaddsa u emergenti, inkluż speċi oħra tal-*Myriophyllum* (eż *Myriophyllum aquaticum*) u *Glyceria maxima* (10). Modifikazzjonijiet tal-kundizzjonijiet tat-test, tad-disinn u tad-durata jistgħu jkunu meħtieġa għal speċi alternattivi. B'mod partikolari, huwa meħtieġ aktar xogħol biex jiġu definiti l-proċeduri xierqa għall-*Myriophyllum aquaticum*. Dawn l-għażliet mhumiex ipprezentati fid-dettall f'dan il-metodu ta' ttestjar, li jiddeskrivi l-approċċ standard għall-esponiment tal-*Myriophyllum spicatum* f'sistema statika permezz tal-faġi tal-ilma.
3. Il-metodu ta' ttestjar japplika għal sustanzi, li għalihom il-metodu ta' ttestjar ġie vvalidat, (ara d-dettalji fir-rapport tar-ring test (9)) jew għal formulazzjonijiet jew tahlitiet magħrufa. Jista' jitwettaq test *Myriophyllum* biex jissodisfa rekwiżit tad-dejta tal-Livell 1 ikkawżat minn sustanza kimika tat-test potenzjali tal-qsim tas-sediment jew mod ta' azzjoni/kwistjonijiet tas-selettività. Bl-istess mod, jista' jkun meħtieġ test *Myriophyllum* ibbażat fil-laboratorju bħala parti minn strateġija ta' livell oghla biex jiġi indirizzat thassib dwar ir-riskju għal pjanti akwatiċi. Ir-raġuni speċifika għat-twettiq ta' test sejra tiddetermina r-rotta tal-esponiment (jiġifieri permezz tal-ilma jew tas-sediment). Qabel l-użu ta' dan il-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar ta' tahlita maħsuba għal skop regolatorju, għandu jiġi kkunsidrat jekk, u jekk ikun hekk għaliex, jista' jipprovdi riżultati adegwati għal dak il-ghan. Tali kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa, meta hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita.

▼ M7

IL-PRINĊIPJU TAT-TEST

4. It-test huwa mfassal biex jevalwa l-effetti relatati mat-tkabbir vegetattiv tal-pjanti tal-*Myriophyllum* li jikbru fil-midja standardizzata (ilma, sediment u nutrijenti). Għal dan il-ghan, apiċi tar-rimjiet ta' pjanti b'saħħithom li ma jifjorixxux huma mħawla f'sediment standardizzat, artifiċjali, li huwa ssupplimentat b'nutrijenti addizzjonali biex jiġi żgurat it-tkabbir tal-pjanti adegwat, u mbagħad jinżamm f'medium Smart u Barko (Appendiċi 1). Wara perjodu ta' stabbiliment biex jippermetti għall-formazzjoni tal-għeruq, il-pjanti huma esposti għal serje ta' konċentrazzjonijiet tat-test miżjuda mal-kolonna tal-ilma. Inkella, l-esponiment permezz tas-sediment jista' jiġi simulat billi jiġi modifikat is-sediment artifiċjali bis-sustanza kimika tat-test u jiġu trapjantati l-pjanti f'dan is-sediment modifikat. Fiż-żewġ każijiet, il-pjanti huma sussegwentement miżmuma taħt kundizzjonijiet ambjentali kontrollati għal 14-il gurnata. Effetti fuq it-tkabbir huma determinati minn valutazzjonijiet kwantitattivi tat-tul tar-rimja, tal-piż frisk u tal-piż niexef, kif ukoll osservazzjonijiet kwalitattivi ta' sintomi bħall-klorozi, nekrozi jew sfigurazzjoni tat-tkabbir.
5. Biex jikkwantifika l-effetti relatati mas-sustanzi kimiċi, it-tkabbir fis-soluzzjonijiet tat-test huwa mqabbel mat-tkabbir tal-pjanti tal-kontroll, u l-konċentrazzjoni li tikkawża inibizzjoni speċifikata x % tat-tkabbir li hija determinata u espressa bħala EC_x ; "x" tista' tkun kwalunkwe valur skont ir-rekwiżiti regolatorji, eż. EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . Għandu jiġi nnotat li l-istimi tal-valuri EC_{10} u EC_{20} huma biss affidabbli u xierqa f'testijiet fejn il-koeffiċjenti tal-varjazzjoni fil-pjanti tal-kontroll jaqgħu taħt il-livell tal-effett li qed ikun stmat, jiġifieri l-koeffiċjenti tal-varjazzjoni għandhom ikunu <20 % għal stima robusta ta' EC_{20} .
6. Kemm ir-rata tat-tkabbir medja speċifika (stmata minn evalwazzjonijiet tat-tul tar-rimja, piż tar-rimja friska u piż tar-rimja niexfa) u r-rendiment (stmat miż-żieda fit-tul tar-rimja, piż tar-rimja friska u piż tar-rimja niexfa) ta' pjanti mhux trattati u trattati għandhom jiġu determinati. Ir-rata speċifika tat-tkabbir (r) u r-rendiment (y) huma sussegwentement użati biex jiġu determinati $E_r C_x$ (e.g. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) u $E_y C_x$ (e.g. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$), rispettivament.
7. Jekk meħtieġ, il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) u l-konċentrazzjoni bl-ebda effett osservat (NOEC) jistgħu jiġu determinati statistikament minn stimi tar-rati tat-tkabbir speċifiċi u mir-rendiment.

INFORMAZZJONI DWAR IS-SUSTANZA KIMIKA TAT-TEST

8. Metodu analitiku, b'sensittività xierqa għall-kwantifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi fil-mezz tat-test, għandu jkun disponibbli.
9. Informazzjoni dwar is-sustanza kimika tat-test li tista' tkun utli biex jiġu stabbiliti l-kundizzjonijiet tat-test tinkludi l-formula strutturali, il-kompożizzjoni u fil-każ ta' sustanzi multi kostitwenti, UVCBs, tahlitiet u formulazzjonijiet, il-purità, is-solubilità tal-ilma, l-istabilità fl-ilma u fid-dawl, il-kostant tad-dissoċjazzjoni tal-aċidu (pK_a), il-koeffiċjent tal-partizzjoni oktanol-ilma (K_{ow}), jekk disponibbli K_d għas-sedimenti, il-pressjoni tal-fwar u l-bijodegradabbiltà. Is-solubilità tal-ilma u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jikkalkulaw il-kostant tal-Liġi ta' Henry, li se jindika jekk huwiex probabbli li jkun hemm telf sinifikanti tas-sustanza kimika tat-test waqt il-perjodu tat-test. Jekk it-telf tas-sustanzi kimiċi tat-test huwa probabbli, it-telf għandu jkun ikkwantifikat u għandhom jiġu dokumentati l-passi sussegwenti biex jiġi kontrollat tali telf. Meta l-informazzjoni dwar is-solubilità u l-istabilità tas-sustanza kimika tat-test ma tkunx wahda ċerta, huwa rrakkomandat li dawn il-karatteristiċi jiġu vvalutati skont il-kundizzjonijiet tat-test, jiġifieri medium tat-tkabbir, temperatura, reġim tad-dawl li għandhom jintużaw fit-test. *Nota:* meta erbiċidi perossidanti li jiddependu fuq id-dawl jiġu ttestjati, id-dawl tal-laboratorju għandu jkun fih il-preżenza ekwivalenti tad-dawl ultravjola tax-xemx li jinsab fid-dawl tax-xemx naturali.

▼ **M7**

10. Il-pH għandu jitkejjel u jiġi aġġustat fil-medium tat-test bħala xieraq. Il-kontroll tal-pH tal-medium tat-test huwa partikolarment importanti, eż. meta jiġu ttestjati metalli jew sustanzi kimiċi li huma instabbli idrolitikament. Aktar gwida għall-ittestjar tas-sustanzi kimiċi b'karatteristiċi kimiċi fiżiċi li jagħmluha diffiċli biex isir it-test hija pprovduta fid-Dokument ta' Gwida tal-OECD (11).

VALIDITÀ TAT-TEST

11. Biex ikunu validi r-riżultati tat-test, it-tul tar-rimja totali medju u l-piż frisk tar-rimja totali medju fil-pjanti tal-kontroll għandhom mill-inqas jirdoppjaw waqt il-fażi tal-esponiment tat-test. Barra minn hekk, il-pjanti tal-kontroll m'għandhomx juru xi sintomu viżiv ta' klorożi u għandhom ikunu viżwalment hiesla mill-kontaminazzjoni minn organiżmi ohra bħall-algi u/jew films batterjali fuq il-pjanti, fuq il-wiċċ tas-sediment u fil-medium tat-test.
12. Il-koeffiċjent medju tal-varjazzjoni għar-rendiment ibbażat fuq il-kejl tal-piż frisk tar-rimja (jiġifieri mill-bidu tat-test sat-tmiem tat-test) fil-kulturi tal-kontroll ma jaqbix il-35 % bejn ir-repliki.

SUSTANZA KIMIKA TA' REFERENZA

13. Sustanza(i) ta' referenza, bħal 3,5-diklorofenol użat fir-ring test (9), għandhom jiġu ttestjati perjodikament sabiex tiġi ċekkjata l-prestazzjoni tal-proċedura tat-test matul iż-żmien. Id-dejta tar-ring test tindika li l-valuri medji EC₅₀ ta' 3,5-DCP għall-varjabbli tar-rispons differenti kienu bejn 4.7 u 6.1 mg/l (ara r-rapport tar-ring test għal dettalji tal-intervall tal-kunfidenza antiċipat madwar dawn il-valuri). Huwa rakkomandabbli li ttestja sustanza kimika tar-referenza mill-inqas darbtejn f'sena jew, fejn l-ittestjar ma jitwettaqx b'mod frekwenti, b'mod parallel mat-testijiet tat-tossicità definittivi. Gwida għall-valuri EC₅₀ mistennija għal 3,5-DCP hija pprovduta fir-Rapport Statistiku tar-Ring test Internazzjonali (9).

DESKRIZZJONI TAL-METODU**L-apparat tat-test**

14. It-test għandu jitwettaq taht kundizzjonijiet ambjentali kontrollati, jiġifieri f'kompartiment tat-tekabbir, kamra tat-tekabbir jew laboratorju, b'tul tal-jum, dawl u temperatura kontrollabbli (ara t-taqsima "Kundizzjonijiet tat-test" paragrafi 56-58). Il-kulturi tal-ħażna għandhom jinżammu separatament mir-riċipjenti tat-test.
15. L-istudju għandu jitwettaq bl-użu ta' riċipjenti tat-test tal-ħġieg bħal akwarji jew beakers; beakers tal-ħġieg taż-2-l (ta' madwar 24 cm għoli u 11 cm dijametru) jintużaw ta' spiss. Madankollu, riċipjenti ohrajn (jiġifieri ikbar) jistgħu jkunu adattati sakemm ikun hemm biżżejjed fond tal-ilma biex jippermetti tkabbir mingħajr limitu u jzomm il-pjanti mgħarrqa tul id-durata tat-test.
16. Qsari tal-pjanti tal-plastik jew tal-ħġieg (madwar 9 cm dijametru u 8 cm għoljin u 500 ml volum) jistgħu jintużaw bħala kontenituri biex iżommu l-pjanti fis-sediment. Inkella, jistgħu jintużaw beakers tal-ħġieg u huma ppreferuti f'ċertu każijiet (eż. l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi idrofobiċi jew sustanzi kimiċi b' K_{ow} għoli).
17. L-għażla tad-daqs tal-qasrija/beaker għandha tiġi kkunsidrata flimkien mal-għażla tar-riċipjenti tat-test u d-disinn tat-test ippreferut (ara hawn taht). Jekk jintuża d-Disinn tat-Test A (rimja waħda għal kull qasrija bi tliet qsari f'kull riċipjent) b'hekk jistgħu jkunu mehtieġa qsari iżgħar jew riċipjenti ikbar. Jekk jintuża d-Disinn tat-Test B (tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull riċipjent) b'hekk id-daqsijiet tal-qasrija u tar-riċipjent iddikjarati għandhom ikunu adegwati. Fil-każijiet kollha, il-fond minimu tal-ilma għandu jkun 12 cm 'il fuq mill-quċċata tas-sediment u l-proporzjon tal-erja tas-superfiċje/volum tal-wiċċ tas-sediment għall-erja tas-superfiċje/volum tal-ilma għandu jiġi rreġistrat.

▼ M7

Organiżmu tat-test

18. L-approċċi ġenerali deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar jistgħu jintużaw biex jittestjaw firxa ta' speċi tal-pjanti akwatiċi. Madankollu, il-kundizzjonijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar ġew imfassla għall-ittestjar tal-ispeċi tal-haxixa tal-morliti tal-ilma, *Myriophyllum spicatum*. Din l-ispeċi tappartjeni għall-familja dikotiledoni, Haloragaceae.
19. *Myriophyllum spicatum* (haxixa tal-morliti tal-Ewrasja) hija speċi bl-għeruq li tittollera firxa wiesgħa ta' kundizzjonijiet u tinsab f'korpi tal-ilma kemm statiki kif ukoll mexxejja. *M. spicatum* hija perenni li tmut lura għall-għeruq tagħha matul ix-xitwa. Il-pjanti normalment jiffjorixxu u jitfgħu iż-żerriegħa liberament għalkemm il-propogazzjoni minn frammenti tal-blanzuni awżil-jarji jew taz-zokk li jinqatgħu b'mod naturali jew wara disturb, hija ta' spiss il-metodu primarju tal-kolonizzazzjoni.

Kultivazzjoni tal-organiżmu tat-test

20. Il-pjanti jistgħu jinkisbu minn popolazzjonijiet naturali jew minn fornituri tal-pjanti akwatiċi. Fiż-żewġ każijiet, is-sors tal-pjanti għandu jiġi dokumentat u l-identità tal-ispeċi għandha tiġi verifikata. Għandha tingħata attenzjoni kbira biex jiġi żgurat li l-ispeċi korretta tinkiseb meta tingabar il-*Myriophyllum spicatum* mill-post, speċjalment f'reġjuni fejn tista' tibridizza ma' speċi oħra *Myriophyllum*. Jekk ikun hemm xi dubju, l-użu ta' kulturi tal-laboratorju verifikati minn sorsi magħrufa huwa rakkomandat. Pjanti li ġew esposti għal kwalunkwe kontaminanti kimiċi, jew miġbura minn siti li huma magħrufa li huma kontaminati, m'għandhomx jintużaw f'dan it-test.
21. F'reġjuni fejn *M. spicatum* mhix disponibbli matul ix-xhur tax-xitwa, jista' jkun meħtieġ il-manteniment fit-tul tal-kulturi tal-hażna taħt kundizzjonijiet ta' serra jew laboratorju. Kulturi tal-hażna għandhom jinżammu taħt kundizzjonijiet simili għall-kundizzjonijiet tat-test għalkemm jistgħu jitnaqqsu l-irradjanza u t-temperatura sabiex titnaqqas il-frekwenza tal-manutenzjoni tal-kultura (eż. meta testijiet tal-*Myriophyllum* mhumieħ ipplanati għal perjodu). Użu ta' akkwarji u qsari tal-pjanti ikbar minn dawk li jintużaw fit-test, huwa rakkomandat sabiex jippermetti l-isparju għall-proliferazzjoni. Il-kompożizzjoni tas-sediment u tal-midja tal-ilma għandha tkun l-istess bħal dik użata għat-testijiet għalkemm metodi alternattivi tal-fertilizzazzjoni tat-test jistgħu jiġu adottati (eż. l-użu ta' formulazzjonijiet tal-fertilizzant kummerċjali ta' rilaxx bil-mod).
22. Pjanti tal-hażna għandhom ikunu vizibilment hielsa mill-kontaminazzjoni ma' kwalunkwe organiżmi oħra, inkluż bebbux, alka filamentuża, fungi u insetti, eż. bajd jew larva tal-kamla *Paraponyx stratiotata* u larva jew adulti tal-curculionidae *Eubrychius velutus*. Jista' jkun meħtieġ it-tlaħlil tal-materjal tal-pjanti fl-ilma frisk biex tiġi eliminata kontaminazzjoni vizibbli. Barra minn hekk, għandhom isiru sforzi biex jitnaqqas l-iżvilupp tal-alka unicellulari u l-kontaminazzjoni batterjoloġika għalkemm l-isterilità kompleta tal-materjal tal-pjanti mhix neċessarja. Kulturi tal-hażna għandhom jiġu sorveljati u trapjantati kif meħtieġ biex jiġi evitat l-iżvilupp tal-kontaminazzjoni tal-alka u tal-batterji. L-arjazzjoni tal-kulturi tal-hażna tista' tkun ta' benefiċċju jekk il-kontaminazzjoni tal-alga jew tal-batterji ssir problematika.
23. Fil-każijiet kollha, il-plantati huma kkulturati/akklimatizzati taħt kundizzjonijiet li huma simili, iżda mhux neċessarjament identiċi, għal dawk użati fit-test għal perjodu adegwat (jiġifieri > ġimagħtejn) qabel l-użu tagħhom f'test.
24. Kulturi tal-hażna li jiffjorixxu m'għandhomx jintużaw f'test minhabba li r-rati tat-tkabbir ġeneralment jonqsu matul u wara li jiffjorixxu.

▼ **M7****Sediment**

25. Is-sediment ifformulat li ġej, ibbażat fuq is-sediment artifiċjali użat fil-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness (8), huwa rrakkomandat għall-użu f'dan it-test. Is-sediment huwa ppreparat kif deskritt f'TM C.28, minbarra ż-żieda tan-nutrienti kif deskritt hawn taht:
- a) 4-5 % pit (piż niexef, skont 2 ± 0.5 % karbonju organiku) viċin kemm jista' jkun għal pH 5.5 sa 6.0; huwa importanti li jintuża l-pit f'forma ta' trab, mithun fin (preferibbilment bid-daqs tal-partikola ta' < 1 mm) u jkun innixxef 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-particelli bejn 50 u 200 μ m).
 - d) Medium tan-nutrijent akweju huwa miżjud b'tali mod li l-aħħar lott tas-sediment ikun fih 200 mg/Kg sediment niexef kemm tal-klorur tal-ammonju kif ukoll tal-fosfat tas-sodju u l-kontenut tal-umdità tal-aħħar tahlita huwa fil-firxa ta' 30-50 %.
 - e) Jizzied karbonat tal-kalċju ta' kwalità kimikament pura (CaCO_3) sabiex jiġi aġġustat il-pH tat-tahlita finali tan-naqal għal 7.0 ± 0.5 .
26. Is-sors tal-pit, it-tafal tal-kawlina u r-ramel għandu jkun magħruf u jkun dokumentat. Jekk l-oġġini ma tkunx magħrufa jew tohloq xi livell tat-thassib, allura l-komponenti rispettivi għandhom jiġu ċċekjati għall-assenza tal-kontaminazzjoni kimika (eż. metalli tqal, komposti organoklorurati, komposti organofosforiċi).
27. Il-kostitwenti niexfa tas-sediment għandhom jithalltu b'mod omogenju qabel tithallat is-soluzzjoni tan-nutrijent akweju kompletament fis-sediment. Is-sediment imxarrab għandu jkun ippreparat mill-inqas jumejn qabel l-użu biex jippermetti t-tixrib komplet tal-pit u biex jipprevjeni milli l-fراك idrofobiċi tal-pit imorru f'wiċċ l-ilma meta s-sediment jinkesa bil-midja; qabel l-użu, is-sediment niedi jista' jinħażen fid-dlam.
28. Għat-test, is-sediment huwa trasferit f'kontenituri ta' daqs xieraq, bħal qsari tal-pjanti ta' dijametru li joqgħod fir-reċipjenti tal-ħġieġ (il-erja tas-superfiċje tas-sediment għandha tkopri madwar 70 % jew aktar tal-erja tas-superfiċje tar-reċipjenti). F'każijiet fejn il-kontenitur għandu t-toqob fil-qieġ, biċċa karta filtru fil-qieġ tal-kontenitur tghin biex iżzomm is-sediment fil-kontenitur. Il-qsari jimtlew bis-sediment b'tali mod li l-wiċċ tas-sediment huwa livell, qabel jitgħatta b'saff irqiq ($\sim 2-3$ mm) ta' materjal inert bħal ramel, żrar ortikulturali fin (jew qroll imfarrak) biex iżomm is-sediment f'postu.

Medium tat-test

29. Il-medium Smart u Barko (12) huwa rakkomandat għall-ikkulturar u l-ittestjar *Myriophyllum spicatum*. Il-preparazzjoni ta' dan il-medium hija deskritta fl-Appendiċi 1. Il-pH tal-medium (fażi tal-ilma) fil-bidu tat-test għandu jkun bejn 7.5 u 8.0 għat-tkabbir ottimali tal-pjanti.

Disinn sperimentali

30. It-test għandu jinkorpora minimu ta' sitt reċipjenti tat-test replikati għall-kontroll mhux trattat u minimu ta' erba' reċipjenti tat-test replikati għal kull wiehed minn minimu ta' hames livelli tal-konċentrazzjoni.
31. Jekk ma tkunx meħtieġa determinazzjoni tal-NOEC, id-disinn tal-ittestjar jista' jiġi mmodifikat biex jizzied in-numru ta' konċentrazzjonijiet u jitnaqqas in-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni.

▼ **M7**

32. Kull reċipjent tat-test jirrappreżenta replika li fiha tliet rimjiet. Hemm żewġ għażliet għat-tkabbir ta' tliet rimjiet f'kull reċipjent tat-test:
- Disinn tat-Test A: rimja waħda għal kull qasrija u tliet qsari għal kull reċipjent.
 - Disinn tat-Test B: tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull reċipjent.
 - Disinni tat-test alternattivi ta' rimja waħda għal kull qasrija għal kull reċipjent tat-test huma aċċettabbli sakemm ir-replikazzjoni hija aġġustata kif mehtieġ biex jinkisbu l-kriterji tal-validità mehtieġa.
33. Ir-reċipjenti tat-test individwali għandhom jiġu assenjati bl-addoċċ lill-gruppi tat-trattament. Disinn bl-addoċċ għall-post tar-reċipjenti tat-test fiż-żona tat-test huwa mehtieġ biex titnaqqas l-influenza ta' differenzi tal-ispazju fl-intensità tad-dawl jew fit-temperatura.

Konċentrazzjonijiet u gruppi ta' kontroll tas-sustanza kimika tat-test

34. Il-konċentrazzjonijiet għandhom normalment isegwu serje ġeometrika; il-fattur tas-separazzjoni bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test m'għandux jeċċedi it-3.2. Għarfien minn qabel tat-tossicità tas-sustanza kimika tat-test minn test li jsib il-medda se jgħin fl-għażla tal-konċentrazzjonijiet tat-test xierqa.
35. Għad-determinazzjoni ta' EC_x , il-konċentrazzjonijiet tat-test iridu jsostnu l-valur EC_x sabiex jiġi żgurat livell ta' kunfidenza adegwat. Pereżempju, jekk tkun qed tikkalkula EC_{50} , l-iktar konċentrazzjoni għolja għandha tkun ikbar mill-valur tal- EC_{50} . Jekk il-valur EC_{50} jinstab barra l-firxa ta' konċentrazzjonijiet tat-test, intervalli ta' kunfidenza assoċjati jkunu kbar u valutazzjoni xierqa tal-fit statistiku tal-mudell tista' ma tkunx possibbli. L-użu ta' aktar konċentrazzjonijiet tat-test se jtejjeb l-intervall tal-valr EC_x li jirrizulta.
36. Sabiex tiddetermina l-LOEC/NOEC (punt tat-tmiem mhux obligatorju), l-inqas konċentrazzjoni tat-test għandha tkun baxxa biżżejjed li t-tkabbir ma jkunx sinifikament differenti mit-tkabbir fil-pjanti tal-kontroll. Barra minn hekk, l-ogħla konċentrazzjoni tat-test għandha tkun għolja biżżejjed li t-tkabbir ikun ferm iktar baxx minn dik ta' fil-kontroll. L-użu ta' aktar repliki se jsaħħaħ il-poter statistiku tal-konċentrazzjoni bla effett/disinn ANOVA.

Test tal-limitu

37. F'kazijiet fejn test li jsib il-medda jindika li s-sustanza kimika tat-test m'għandha l-ebda effett negattiv f'konċentrazzjonijiet sa 100 mg/l jew sal-limitu tas-solubbiltà tagħha fil-medium tat-test jew fil-każ ta' formulazzjoni sal-limitu tad-dispersibbiltà, jista' jittiehed test tal-limitu biex jiffaċilita paragon tar-risposti fi grupp tal-kontroll u fi grupp tat-trattament wiehed — 100 mg/l jew konċentrazzjoni ugħali għal-limitu tas-solubbiltà — jew 1 000 mg/kg sediment niexef. Dan it-test għandu jsegwi l-prinċipji ġenerali ta' test tad-doża-rispons standard, bl-eċċezzjoni li zieda fin-numru minimu tar-repliċi għal sitt reċipjenti tat-test għal kull kontroll u konċentrazzjoni hija rakkomandata. It-tkabbir fil-grupp ta' kontroll u trattament jista' jiġi analizzat permezz ta' test tal-istatistika biex jitqabblu l-media, eż. Test-t ta' Student.

Is-soluzzjonijiet tat-test

38. Soluzzjonijiet tat-test huma normalment ippreparati bid-dilwizzjoni ta' soluzzjoni tal-ħażna, ippreparata billi tholl jew ixxerred is-sustanza kimika tat-test fil-medium Smart u Barko, bl-użu ta' ilma demineralizzat (jiġifieri distillat jew dejonizzat) (ara l-Appendiċi 1).

▼ M7

39. L-oghla konċentrazzjoni tat-test normalment m'għandhiex teċċedi s-solubbiltà tal-ilma tas-sustanza kimika tat-test jew, fil-każ ta' formulazzjonijiet, id-dispersibbiltà taht il-kundizzjonijiet tat-test.
40. Għal sustanzi kimiċi ta' solubbiltà tal-ilma baxxa jista' jkun mehtieg li tiġi ppreparata soluzzjoni tal-ħażna konċentrata jew dispersjoni tas-sustanza kimika bl-użu ta' solvent organiku jew dispersant sabiex jiffaċilita ż-żieda ta' kwantitajiet preċiżi tas-sustanza kimika tat-test għall-medium tat-test u jgħin fid-dispersjoni u x-xoljiment tiegħu. Għandu jsir kull sforz biex jiġi evitat l-użu ta' tali solventi jew dispersanti. Ma għandu jkun hemm ebda fitotossicità li tirriżulta mill-użu ta' solventi jew aġenti dispersivi awżiljarji. Pereżempju, solventi li jintużaw b'mod komuni li ma jikkawżawx fitotossicità fil-konċentrazzjonijiet sa 100 µl/l jinkludu aċeton u dimetilformamid. Jekk jintuża solvent jew dispersant, il-konċentrazzjoni finali tiegħu għandha tiġi rappurtata u miżmuma fil-minimu (≤ 100 µl/l). Taht dawn iċ-ċirkostanzi, it-trattamenti u l-kontrolli (tas-solvent) kollha għandu jkun fihom l-istess konċentrazzjoni ta' solvent jew dispersant. Repliki tal-kontroll mhux trattati li ma fihomx solvent jew dispersant huma wkoll inkorporati fid-disinn tat-test. Tingħata gwida ulterjuri dwar l-użu ta' aġenti dispersivi f'Dokument ta' Gwida OECD (11).

PROCEDURA TAT-TEST

41. Il-proċedura tat-test tvarja skont ir-rotta tal-applikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test (jiġifieri permezz tal-faži tal-ilma jew tas-sediment). L-imġiba probabbli tas-sustanza kimika tat-test f'sistema tal-ilma-sediment għandha tiġi kkunsidrata biex tinforma l-għażla tar-reġim tal-esponiment użat fit-test (jiġifieri tiġdid statiku jew mhux statiku, ilma modifikat jew sediment modifikat). Testijiet tas-sediment modifikat jistgħu jiġu ppreferuti f'ċertu każijiet għal sustanzi kimiċi li huma mbassra li jisseparaw is-sediment b'mod sinifikanti.

Faži tal-istabbilment

42. Apici/ponot tar-rimja b'saħħithom, jiġifieri mingħajr rimjiet fil-ġenb, jinqatgħu mill-pjanti tal-kultura biex jagħtu tul tar-rimja ta' 6 cm (± 1 cm). Għad-Disinn tat-Test A (rimja waħda għal kull qasrija u tliet qsari għal kull reċipjent) ponot tar-rimja singoli huma mħawla f'kull qasrija. Għad-Disinn tat-Test B (tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull reċipjent) erba' sa ħames apici huma mħawla f'kull qasrija li fiha s-sediment.
43. Fiz-żewġ każijiet, il-qsari żejda għandhom jiġu mħawla biex jippermettu għall-għażla ta' pjanti uniformi fil-bidu tat-test, kif ukoll biex jipprovdu pjanti żejda biex jintużaw għall-ispezzjoni tat-tkabbir tal-għeruq immedjatement qabel it-trattament u pjanti żejda biex jinhasdu għall-bijomassa tar-rimja u l-kejl tat-tul fil-Jum 0.
44. Rimjiet huma mdahħla b'tali mod li madwar tliet cm, li jkopru mill-inqas żewġ nodi, huma taht il-wieċ tas-sediment.
45. Il-qsari huma mbaġħad trasferiti fir-reċipjenti tat-test taht l-istess kundizzjonijiet ambjentali għall-faži tal-esponiment u miżmuma għal sebat ijiem f'medium Smart u Barko biex jiġi kkawżat l-iżvilupp tal-għeruq.
46. Wara dan iż-żmien, bosta pjanti fi qsari żejda għandhom jitneħħew għall-ispezzjoni tat-tkabbir tal-għeruq. Jekk it-tkabbir tal-għeruq mhux viżibbli (jiġifieri l-punti tal-għeruq mhumiex viżibbli), allura l-faži tal-istabbilment għandha tiġi estiża sakemm it-tkabbir tal-għeruq ikun viżibbli. Dan il-pass huwa rrakkomandat biex jiżgura li l-pjanti qed jikbru b'mod attiv fil-hin tal-bidu tat-test.

▼ **M7****Għażla ta' materjal tal-pjanti uniformi.**

47. Għad-Disinn tat-Test A (rimja waħda għal kull qasrija u tliet qsari għal kull reċipjent) il-qsari huma magħżulin għall-uniformità qabel il-bidu tat-test. Għad-Disinn tat-Test B (tliet rimjiet għal kull qasrija u qasrija waħda għal kull reċipjent), pjanti żejda huma mnehhija biex iħallu tliet pjanti li huma uniformi fid-daqs u fid-dehra.

Esponiment permezz tal-faži tal-ilma

48. Qsari, magħżula għall-uniformità, huma mpoġġija fir-reċipjenti tat-test kif mehtieg għad-disinn sperimentali. Il-medium Smart u Barko huwa mbagħad miżjud mar-reċipjenti tat-test. Għandha tinghata attenzjoni biex jiġi evitat it-tahwid fis-sediment. Għal dan il-ghan, jista' jiżdied mezz bl-użu ta' lembut jew diska tal-plastik biex jgħatti s-sediment waqt li l-medium jitferra' fir-reċipjenti tat-test sakemm id-diska titneħħa immedjatement wara. Inkella, il-qsari tal-pjanti jistgħu jitqieghdu fir-reċipjenti tat-test wara ż-żieda tal-midja. Fiż-żewġ każijiet, midja friska tista' tintuża fil-bidu tal-faži tal-esponiment, jekk mehtieg biex timminimizza l-akkumulazzjoni potenzjali tal-alka u tal-batterji jew biex tippermetti l-preparazzjoni ta' lottijiet singoli tas-soluzzjoni tat-test madwar repliki.
49. It-tul tar-rimja 'l fuq mis-sediment titkejjel, jew qabel jew wara ż-żieda tal-medium.
50. L-ammonti rilevanti tas-sustanza kimika tat-test jistgħu jiġu miżjuda mal-medium tat-test qabel jiżdied mar-reċipjenti tat-test. Inkella, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi introdotta mal-medium wara li tizdied mar-reċipjenti tat-test. F'dan il-każ, għandha tinghata attenzjoni biex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test tkun imqassma b'mod omoġenju fis-sistema tat-test mingħajr ma tid-disturba s-sediment.
51. Fil-każijiet kollha, id-dehra (eż. ċara, imdardra, eċċ) tal-medium tat-test hija reġistrata fil-bidu tat-test.

Esponiment permezz tas-sediment

52. Sedimenti modifikati tal-konċentrazzjoni magħżula huma ppreparati biż-żieda ta' soluzzjoni tas-sustanza kimika tat-test direttament mas-sediment frisk. Soluzzjoni tal-ħażna tas-sustanza kimika tat-test dissolta f'ilma dejonizzat tithallat mas-sediment iġformulat b'miżna tal-irrumblar, hallat tal-ghalf jew thallit bl-idejn. Jekk fit li xejn tinhall fl-ilma, is-sustanza kimika tat-test tista' tiġi dissolta f'volum żgħir kemm jista' jkun ta' solvent organiku xieraq (eż. essan, acetone jew kloroformi). Din is-soluzzjoni hija mbagħad imħallta ma' madwar 10 g ta' ramel tal-kwarz għal reċipjent tat-test wiehed. Is-solvent jithalla jevapora u r-ramel huwa mbagħad imħallat mal-ammont xieraq tas-sediment għal kull beaker tat-test. Aġenti li huma volatili faċilment jistgħu jintużaw biex iħollu, jferrxu jew jemulsifikaw is-sustanza kimika tat-test. Għandu jiġi mfakkar li l-volum/piż tar-ramel modifikat bis-sustanza kimika tat-test għandu jiġi kkunsidrat fit-thejija finali tas-sediment (jiġifieri s-sediment għandu għalhekk ikun ippreparat b'inqas ramel). Għandha tinghata attenzjoni biex jiġi żgurat li s-sustanza kimika tat-test miżjuda mas-sediment tiġi distribwita sew u b'mod uniformi fis-sediment.
53. Is-sediment modifikat jimtela fil-qsari (kif deskritt hawn fuq). Il-pjanti, magħżula għall-uniformità u għal sistema tal-għerug adegwata, jitneħħew mill-qsari użati waqt il-faži tal-istabbilment u jiġu trapjantati fis-sediment modifikat kif deskritt hawn fuq.
54. Il-qsari jitpoġġew fir-reċipjenti tat-test kif mehtieg għad-disinn sperimentali. Il-medium Smart u Barko huwa mbagħad miżjud b'attenzjoni (jiġifieri bl-użu ta' lembut) sabiex jiġi evitat it-tahlit fis-sediment. It-tul tar-rimja 'l fuq mis-sediment titkejjel, jew qabel jew wara ż-żieda tal-midja.

▼ **M7****Manutenzjoni tal-livelli tal-ilma waqt id-durata tat-test**

55. Il-volum tal-ilma finali għandu jiġi registrat u l-livell tal-ilma jiġi mmarkat fuq kull reċipjent tat-test. Jekk l-ilma jevapora waqt it-test b'aktar minn 10 %, il-livell tal-ilma għandu jiġi aġġustat bl-ilma distillat. Jekk ikun meħtieġ, il-beakers jistgħu jitgħattew b'mod laxx b'ghatu trasparenti bħal għotjien tal-plastik trasparenti biex tiġi minimizzata l-evaporazzjoni u l-kontaminazzjoni ma' spori tal-alka.

Kundizzjonijiet tat-test

56. Dawl fluworexxenti baxx u/jew qawwi jintuza biex jipprovdi l-irradjanza tad-dawl fil-medda ta' madwar $140 (\pm 20) \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ meta mkejjejl bħala radjazzjoni attiva fotosintetika (400-700 nm) fil-wieċ tal-ilma u bl-użu ta' proporzjon ċar:skur ta' 16:8 h. Kwalunkwe differenza mill-irradjanza tad-dawl magħżula fl-erja tat-test m'għandhiex teċċedi l-medda ta' $\pm 15\%$.
57. It-temperatura fir-reċipjenti tat-test hija ta' $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
58. Il-pH tal-medium ta' kontroll ma għandux jidjed b'aktar minn 1.5 unitajiet matul it-test. Madankollu, devjazzjoni ta' aktar minn 1.5 unità ma tagħmilx it-test invalidu meta jkun jista' jintwera li l-kriterji tal-validità speċifikati qabel jiġu sodisfatti.

Durata tat-test

59. Il-perjodu ta' esponiment huwa ta' 14-il ġurnata.

Kejliet u determinazzjonijiet analitiċi

60. Wara l-fazi tal-istabbiliment u immedjatement qabel it-trattament (jiġifieri fil-Ġurnata 0), pjanti żejda minn hames qsari magħżula każwalment għat-tliet pjanti għal kull disinn tal-qasrija jew 15-il qasrija għal pjanta waħda għal kull disinn tal-qasrija, huma maħsuda għall-evalwazzjoni tat-tul tar-rimja u l-piż frisk u niexef kif deskritt hawn taħt.
61. Għal pjanti trasferiti fil-fazi tal-esponiment, isiru l-evalwazzjonijiet li ġejjin kif muri fit-Tabella 1:
- Evalwazzjonijiet tat-tul tar-rimja prinċipali, numru tar-rimja tal-ġenb u tul tar-rimja tal-ġenb huma rreġistrati għall-inqas fl-aħħar tal-perjodu tal-esponiment (eż. fil-ġurnata 14).
 - Evalwazzjonijiet viżwali tas-saħħa tal-pjanti huma rreġistrati mill-inqas tliet darbiet waqt il-perjodu tal-esponiment (eż. fil-ġranet 0, 7 u 14).
 - Evalwazzjonijiet tal-piż frisk u l-piż xott tar-rimja huma magħmulin fl-aħħar tat-test (jiġifieri fil-Ġurnata 14).
62. It-tul tar-rimja huwa determinat bl-użu ta' riga. Jekk rimjiet tal-ġenb huma preżenti, in-numru u t-tulijiet tagħhom għandhom jitkejlu wkoll.
63. Evalwazzjonijiet viżwali tas-saħħa tal-pjanti jsiru billi tiġi rreġistrata d-dehra tal-pjanti u l-kundizzjoni ġenerali tal-medium tat-test. Osservazzjonijiet li għandhom jiġu nnotati jinkludu:
- In-nekrozi, il-klorozi jew kwalunkwe telf tal-kulur bħal ħmurija eċċessiva relattiva għall-pjanti tal-kontroll.
 - L-iżvilupp tal-kontaminazzjoni batterjali jew tal-alka;
 - Anormalitajiet tat-tkabbir bħal nuqqas fit-tkabbir, tul internodali mibdul, rimjiet/weraq mgħawwġin, il-proliferazzjoni ta' rimjiet tal-ġenb, telf tal-weraq, telf tal-pessjoni u frammentazzjoni taz-zokk.

▼ **M7**

- Evalwazzjonijiet viżwali tas-saħħa tal-għeruq isiru fit-tmiem tat-test, billi jinhasel is-sediment b'attenzjoni mill-għeruq biex jippermettu l-osservazzjoni tas-sistema tal-għeruq. Skala għall-evalwazzjoni proposta, relattiva għall-pjanti tal-kontroll, tidher hawn taħt:
- 1) għeruq assenti
 - 2) fiit għeruq
 - 3) żvilupp moderat tal-għeruq
 - 4) żvilupp tal-għeruq tajjeb ħafna, simili għall-kontrolli
64. Evalwazzjonijiet tal-piż frisk isiru fil-bidu u fl-aħħar tat-test billi taqta' r-rimja fil-livell tas-sediment u tixxotta qabel l-użin. Għandha tingħata attenzjoni biex jitnehhew partikoli tas-sediment li jistghu jaderixxu għall-bażi tar-rimja. Il-materjal tar-rimja mbagħad jitpoġġa f'forn tat-tnixxif f'madwar 60 °C u jiġi mnixxef għal piż kostanti, qabel jerga' jintiżen u jiġi rreġistrat il-piż niexef.
65. Sommarju tal-evalwazzjonijiet bijoloġiċi minimi meħtieġa tul id-durata tat-test huwa pprovdut fit-Tabella 1.

Tabella 1

Skeda tal-evalwazzjoni

Trattament ta' ġurnata wara (DAT)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Tul tar-rimja, tul tar-rimja tal-ġenb u numru	Evalwazzjoni viżwali tar-rimjiet	Piż frisk u niexef tar-rimja Evalwazzjoni viżwali tal-għeruq	pH O ₂
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: jindika li evalwazzjonijiet huma meħtieġa f'dawn l-okkażjonijiet
 —: jindika li mhux meħtieġ il-kejl

Frekwenza tal-kejl u determinazzjonijiet analitiċi

66. It-temperatura tal-medium fil-kontenitur supplimentari miżmum fl-istess kundizzjonijiet tal-kamra ta' tkabbir, inkubatur jew kamra għandu jiġi rreġistrat mill-inqas darba kuljum (jew kontinwament b'logger tad-dejta).
67. Il-koncentrazzjoni tal-pH u tal-ossigenu tal-medium tat-test għandha tiġi ċċekkjata fil-bidu tat-test, mill-inqas darba waqt l-istudju u fl-aħħar tal-istudju fir-reċipjenti replikati kollha. F'kull okkażjoni, il-kejl għandhom jittiehdu fl-istess hin tal-ġurnata. Jekk jintużaw soluzzjonijiet tal-massa biex jippreparaw ir-repliki kollha f'kull konċentrazzjoni tat-test, allura kejl wiehed ta' kull soluzzjoni tal-massa huwa aċċettabbli fil-Ġurnata 0.
68. L-irradjanza għandha titkejjel fil-kamra tat-tkabbir, inkubatur jew kamra f'punti ekwivalenti għal-livell tal-wiċċ tal-ilma. Il-kejl għandhom isiru mill-inqas darba fil-bidu tat-test jew waqt it-test. Il-metodu ta' detezzjoni u kejl, b'mod partikolari t-tip ta' senser, jaffettwa l-valur imkejjel. Is-sensors

▼ M7

sferiċi (li jirrispondu għad-dawl minn angoli 'l fuq u taht il-pjan ta' kejl) u s-sensers "cosine" (li jirrispondu għad-dawl mill-angoli kollha 'l fuq mill-pjan ta' kejl) huma ppreferuti minn sensers unidirezżjonali, u ser jagħtu riżultati tal-qari oghla, għal sors ta' dawl b'hafna punti tat-tip deskritt hawnhekk.

Kejljet analitiċi tas-sustanza kimika tat-test

69. L-applikazzjoni korretta tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi appoġġata mill-kejljet analitiċi tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test.
70. Kampjuni tal-ilma għandhom jingabru għall-analiżi tas-sustanza kimika tat-test f'tit wara l-bidu tat-test (jiġifieri fil-ġurnata tal-applikazzjoni għal sustanzi kimiċi tat-test stabbli jew siegħa wara l-applikazzjoni għal sustanzi kimiċi li mhumiex stabbli) u fit-tmiem tat-test għall-konċentrazzjonijiet tat-test kollha.
71. Il-konċentrazzjonijiet fis-sediment u fl-ilma tal-pori tas-sediment għandhom ikunu determinati fil-bidu tat-test u fit-tmiem tat-test, tal-inqas fl-ogħla konċentrazzjoni tat-test, sakemm is-sustanzi kimiċi tat-test huma magħrufa li jkunu stabbli fl-ilma (> 80 % tan-nominali). Il-kejl fis-sediment u fl-ilma tal-pori jista' ma jkunx mehtieġ jekk il-partizzjoni tas-sustanza kimika tat-test bejn l-ilma u s-sediment giet determinata b'mod ċar fi studju tal-ilma/sediment taht kundizzjonijiet kumparabbli (eż. proporzjon tas-sediment ma' ilma, metodu tal-applikazzjoni, tip tas-sediment).
72. It-tehid ta' kampjuni tas-sediment fil-bidu tat-test huwa probabbli li jfixxkel is-sistema tat-test. Għalhekk, reċipjenti tat-test trattati addizzjonalment jistgħu jkunu mehtieġa biex jiffacilitaw determinazzjonijiet analitiċi fil-bidu tat-test u fit-tmiem tat-test. Bl-istess mod, fejn evalwazzjonijiet intermedji huma neċessarji, jiġifieri fil-ġurnata 7 u l-analizijiet jehtieġu kampjuni kbar tas-sediment li ma jistgħux jitnehhew b'mod faċli mis-sistema tat-test, determinazzjonijiet analitiċi għandhom jitwettqu bl-użu ta' reċipjenti tat-test addizzjonalment trattati bl-istess mod bħal dawk użati għall-evalwazzjonijiet bijoloġiċi.
73. Ċentrifugazzjoni, pereżempju, ta' 10 000 g u 4 °C għal 30 minuta hija rakkomandata biex tiżola l-ilma interstizjali. Madankollu, jekk is-sustanza kimika tat-test tintwera li ma tassorbix il-filtri, il-filtrazzjoni tista' tkun aċċettabbli wkoll. F'ċertu każijiet, jista' ma jkunx possibbli li tanalizza konċentrazzjonijiet fl-ilma tal-pori jekk id-daqs tal-kampjun huwa zgħir wisq.
74. F'testijiet semistatiċi (jiġifieri esponiment permezz tal-fażi tal-ilma) fejn il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika (sustanzi kimiċi) tat-test mhix mistennija li tibqa' fi hdan l-20 % tal-konċentrazzjoni nominali tul id-durata tat-test mingħajr it-tiġdid tas-soluzzjonijiet tat-test, soluzzjonijiet tat-test użati u ppreparati friski għandhom jittiehdu kampjuni minnhom għall-analizijiet tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test f'kull tiġdid.
75. F'każijiet fejn il-konċentrazzjoni inizjali mkejla tas-sustanza kimika tat-test mhix fi hdan l-20 % tan-nominali iżda fejn tista' tiġi pprovduta evidenza suffiċjenti biex turi li l-konċentrazzjonijiet inizjali huma ripetibbli u stabbli (jiġifieri fi hdan il-medda ta' 80-120 % tal-konċentrazzjoni inizjali), id-determinazzjonijiet kimiċi jistgħu jitwettqu biss fuq l-ogħla u l-inqas konċentrazzjonijiet tat-test.
76. Fil-każijiet kollha, id-determinazzjoni tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test għandhom bżonn jitwettqu biss fuq reċipjent replikat f'kull konċentrazzjoni tat-test. Inkella, is-soluzzjonijiet tat-test tar-repliki għal kull konċentrazzjoni jistgħu jingabru flimkien għall-analizijiet.
77. Jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test giet miżmuma fi hdan l-20 % tal-konċentrazzjoni inizjali nominali jew imkejla matul it-test, b'hekk l-analiżi tar-riżultati u d-derivazzjoni sussegwenti tal-punti tat-tmiem tista' tkun ibbazata fuq valuri inizjali nominali jew imkejla.

▼ **M7**

78. F'dawn il-każijiet, konċentrazzjonijiet tal-effett għandhom ikunu bbażati fuq konċentrazzjonijiet tal-ilma nominali jew imkejla fil-bidu tat-test.
79. Madankollu, jekk hemm evidenza li l-konċentrazzjoni naqset (jigifieri mhix miżmuma fi hdan l-20 % tal-konċentrazzjoni nominali jew imkejla inizjali fil-kompartiment trattat) matul it-test, b'hekk l-analiżi tar-riżultati għandha tkun ibbażata fuq il-konċentrazzjoni medja geometrika waqt l-esponiment jew mudelli li jiddeskrivu t-tnaqqis tal-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fil-kompartiment trattat (11).

EVALWAZZJONI TAD-DEJTA

80. F'każijiet fejn l-użu ta' solvent/aġent ta' dispersjoni huwa meħtieġ, id-dejta minn solvent u minn kontrolli mhux trattati tista' tingabar flimkien għall-finijiet tal-analiżijiet statistiċi sakemm ir-risponsi tas-solvent u tal-kontrolli mhux trattati ma jkunux ferm differenti.

Varjabbli ta' rispons

81. L-għan tat-test huwa li jiddetermina l-effetti tas-sustanza kimika tat-test fuq it-tkabbir veġetattiv tal-ispeċi tat-test, bl-użu ta' żewġ varjabbli tar-rispons, rata tat-tkabbir speċifika medja u rendiment, kif ġej:

Rata ta' tkabbir speċifika medja

82. Dan il-varjabbli tar-rispons huwa bbażat fuq bidliet fil-logaritmi tat-tul tar-rimja totali, piż tar-rimja friska totali u piż tar-rimja niexfa totali, matul iż-żmien fil-kontrolli u f'kull grupp tat-trattament. Dan il-varjabbli huwa kkalkulat għal kull replika ta' kull grupp tal-kontroll u tat-trattament. It-tul u l-piż medju tat-tliet pjanti għal kull reċipjent tat-test (replikati) u, sussegwentement, ir-rata tat-tkabbir għal kull replikat, għandhom jiġu kkalkulati bl-użu tal-formula li ġejja:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

fejn:

μ_{i-j} : rata ta' tkabbir speċifika medja mill-hin i sa j

N_i : varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'hin i

N_j : varjabbli ta' kejl fil-kontenitur tat-test jew kontroll f'hin j

t: perjodu ta' hin minn i sa j

83. Mir-risposti tar-replikati, valur medju għar-rata tat-tkabbir flimkien mal-istimi tal-varjanza għandhom jiġu kkalkulati għal kull grupp tat-trattament u tal-kontroll.
84. Ir-rata ta' tkabbir speċifika medja għandha tiġi kkalkolata għall-perjodu ta' ttestjar kollu (il-hin "i" fil-formola ta' hawn fuq huwa l-bidu tat-test u l-hin "j" huwa t-tmiem tat-test). Għal kull konċentrazzjoni tat-test u ta' kontroll, ikkalkola valur medju għar-rata ta' tkabbir speċifika medja flimkien mal-istimi tal-varjanza.

▼ **M7**

85. Perċentwal ta' inibizzjoni tar-rata ta' tkabbir (I_r) jista' jiġi kkalkulat fuq kull konċentrazzjoni tat-test (grupp ta' trattament) bil-formula li ġejja:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

fejn:

% I_r : perċentwal ta' inibizzjoni frata medja ta' tkabbir speċifiku

μ_C : valur medju għal μ in fil-kontroll

μ_T : valur medju għal μ in fil-grupp tat-trattament

Rendimento

86. Dan il-varjabbli tar-rispons huwa bbażat fuq bidliet fit-tul tar-rimja totali, piż tar-rimja friska totali u piż tar-rimja niexfa totali, matul iż-żmien fil-kontrolli u f'kull grupp tat-trattament. Il-perċentwal medju fir-rendiment (% I_y) jista' jiġi kkalkulat għal kull grupp tat-trattament kif ġej:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

fejn:

% I_y : tnaqqis perċentwali fir-rendiment

b_C : bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu għall-grupp ta' kontroll

b_T : bijomassa finali li minnha titnaqqas il-bijomassa tal-bidu fil-grupp ta' trattament

Ipplottjar tal-kurvi konċentrazzjoni-rispons

87. Il-kurvi tal-konċentrazzjoni-rispons li għandhom x'jaqsmu mal-inibizzjoni tal-varjabbli tar-rispons (I_r jew I_y) ikkalkulat kif jidher hawn fuq u l-konċentrazzjoni tal-log tas-sustanza kimika tat-test għandhom jiġu pplottjati.

Stimi tal- EC_x

88. Stimi tal- EC_x (eż. EC_{50}) għandhom ikunu bbażati kemm fuq ir-rata speċifika tat-tkabbir medja (E_rC_x) kif ukoll ir-rendiment (E_yC_x), li kull wieħed minnhom għandu mbagħad ikun ibbażat fuq il-piż tar-rimja friska totali, il-piż tar-rimja niexfa totali u t-tul tar-rimja totali.
89. Għandu jiġi nnotat li l-valuri EC_x ikkalkulati bl-użu ta' dawn il-varjabbli tar-rispons mhumiex komparabbli u din id-differenza hija rikonoxxuta meta jintużaw ir-riżultati tat-test. Valuri EC_x ibbażati fuq ir-rata tat-tkabbir speċifika medja (E_rC_x) fil-maġġoranza tal-każi se jkunu oghla minn riżultati bbażati fuq ir-rendiment (E_yC_x) — jekk il-kundizzjonijiet tat-test ta' dan il-metodu ta' ttestjar huma osservati — minhabba l-bażi matematika tal-approċċi rispettivi. Din id-differenza m'għandhiex tkun interpretata bħala differenza fis-sensittività bejn iż-żewġ varjabbli tar-rispons, iżda sempliċement li l-valuri huma differenti matematikament.

Proċeduri ta' statistika

90. L-għan huwa li tinkiseb relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u r-rispons b'analizi tar-rigressjoni. Huwa possibbli li tintuża rigressjoni lineari ponderata wara li tkun twettqet trasformazzjoni linearizzanti tad-data dwar ir-rispons — eż. f'unitajiet probit jew logit jew Weibull (13), iżda proċeduri ta' rigressjoni mhux lineari huma tekniki ppreferuti li jimmanigġjaw ahjar irregolaritajiet inevitabbli fid-dejta u devjazzjonijiet minn distribuzzjonijiet uniformi. Meta jkunu viċin iż-żero jew inibizzjoni totali, tali irregolaritajiet jistghu

▼ **M7**

jitkabbru bit-trasformazzjoni, u dan jinterferixxi mal-analizi (13). Għandu jiġi nnotat li l-metodi standard tal-analizi li jużaw it-trasformazzjonijiet probit, logit jew Weibull huma maħsuba għall-użu fuq id-data kwantali (eż. mortalità jew sopravivenza), u għandhom jiġu modifikati biex jakkomodaw ir-rata tat-tkabbir jew irendu d-dejta. Proċeduri speċifiċi għad-determinazzjoni tal-valuri EC_x minn dejta kontinwa jistgħu jinsabu f'(14) (15) (16).

91. Għal kull varjabbli ta' rispons li jiġi analizzat, għandha tintuża r-relazzjoni konċentrazzjoni-rispons biex jiġu kkalkulati l-estimi ta' punti ta' valuri EC_x . Il-limiti tal-kunfidenza ta' 95 % għal kull stima huma determinati u l-adekwatezza tad-dejta tar-rispons u l-mudell tar-rigressjoni għandhom jiġu evalwati jew grafikament jew statistikament. L-analizi tar-rigressjoni għandha ssir permezz ta' risponsi tar-repliki individwali, mhux il-medji tal-grupp ta' trattament.
92. Stimu EC_{50} u limiti ta' kunfidenza jistgħu wkoll jiġi miksuba bl-użu ta' interpolazzjoni lineari b'sekwenza ta' istruzzjonijiet inizjali (18), jekk il-mudelli/metodi ta' rigressjoni aċċessibbli m'humiex xierqa għad-dejta.
93. Għal stima tal-LOEC u għalhekk tal-NOEC, huwa mehtieg li jitqabblu l-medji ta' trattament permezz ta' analizi tat-tekniki ta' varjanza (ANOVA). Il-medja għal kull konċentrazzjoni mbagħad titqabbel mal-medja tal-kontroll bl-użu ta' metodu ta' ttestjar xieraq (eż. testijiet ta' Dunnett, Williams) (19) (20) (21) (22). Huwa mehtieg li jiġi evalwat jekk l-assunzjoni ANOVA tad-distribuzzjoni normali (ND) u tal-omoġeneità tal-varjanza (VH) tal-varjanza iżzommx. Din l-evalwazzjoni għandha titwettaq bl-użu ta' test Shapiro-Wilks (ND) jew test Levene (VH). In-nuqqas li tinthalaq l-assunzjoni ta' ND u l-omoġeneità tal-varjanzi tista' xi kultant tiġi korretta bit-trasformazzjoni logaritmika tad-dejta. Jekk l-eteroġeneità tal-varjanza u/jew tad-devjazzjoni minn ND hija estrema u ma tistax tiġi kkorreguta bit-trasformazzjoni, l-analizi b'metodi bħat-t-test Bonferroni-Welch, it-test step-down Jonkheere Terpstra u t-Test Bonferroni-Median għandhom jiġu kkunsidrati. F'(16) tista' tinstab gwida addizzjonali dwar id-determinazzjoni tal-NOEC.

IR-RAPPORTAR

94. Ir-rapport tat-test jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test

Sustanza monokostitwenti:

- dehra fiżika, solubbiltà fl-ilma, u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impurità jiet bħala xierqa u prattikament fattibbli, eċċ.

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet:

- karatterizzati kemm jista' jkun bl-identità kimika (ara hawn fuq), okkorrenza kwantitattiva u karatteristiċi fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test

- l-isem xjentifiku u s-sors.

Kundizzjonijiet tat-test

- durata u kundizzjonijiet tal-fażi tal-istabbilment;
- il-proċedura tat-test użata (statika, semistatika, ppulsata);

▼ **M7**

- id-data tal-bidu tat-test u d-durata tiegħu.
- il-medium tat-test, jigifieri s-sediment u l-medium tan-nutrijent likwidu;
- deskrizzjoni tad-disinn sperimentali: kompartiment/kamra tat-tkabbir jew laboratorju, reċipjenti tat-test u għotjien, volumi tas-soluzzjoni, tul u piż tal-pjanti tat-test għal kull reċipjent tat-test fil-bidu tat-test, proporzjon tal-wieċ tas-sediment mal-wieċ tal-ilma, proporzjon tal-volum tas-sediment u tal-ilma;
- il-konċentrazzjonijiet tat-test (nominali u mkejla kif xierqa) u n-numru ta' repliki għal kull konċentrazzjoni;
- metodi ta' preparazzjoni tas-soluzzjonijiet ewlenin u tat-test inkluz l-użu ta' kwalunkwe solvent jew aġent dispersiv;
- it-temperatura matul it-test;
- sors tad-dawl, irradjanza ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)
- valuri pH tat-test u midja tal-kontroll kif ukoll id-dehra tal-midja tat-test fil-bidu u fit-tmiem tat-test;
- konċentrazzjonijiet tal-ossigenu;
- il-metodu tal-analiżi bid-dejta tal-valutazzjoni ta' kwalità xierqa (studji tal-validazzjoni, devjazzjonijiet standard jew limiti tal-kunfidenza ta' analiżijiet);
- metodi għad-determinazzjoni tal-varjabbli tal-kejl, eż., tul, piż niexef, piż frisk;
- id-devjazzjonijiet kollha minn dan il-metodu ta' ttestjar.

Riżultati

- dejta mhux ipproċessata: tul tar-rimja u piż tar-rimja ta' pjanti/qasira u varjabbli tal-kejl oħra f'kull reċipjent tat-test u tal-kontroll f'kull osservazzjoni u okkażjoni tal-analiżi skont l-iskeda tal-evalwazzjoni pprovduta fit-Tabella 1;
- medji u devjazzjonijiet standard għal kull varjabbli ta' kejl;
- il-kurvi tat-tkabbir għal kull konċentrazzjoni;
- l-irduppar tal-hin/rata tat-tkabbir fil-kontroll ibbażat fuq it-tul tar-rimja u l-piż frisk inkluz il-koeffiċjent tal-varjazzjoni għar-rendiment tal-piż frisk;
- il-varjabbli ta' rispons ikkalkolati għal kull replikat tat-trattament, bil-valuri medji u l-koeffiċjenti ta' varjazzjoni għar-repliki;
- rappreżentazzjoni grafika tar-relazzjoni bejn il-konċentrazzjoni u l-effett;
- stimi ta' punti ta' tmiem tossiċi għal varjabbli ta' rispons eż. EC_{50} , u l-intervalli ta' kunfidenza assoċjati. Jekk ikunu kkalkolati, l-LOEC u/jew l-NOEC u l-metodi statistiċi użati għad-determinazzjoni tagħhom.
- jekk tintuża ANOVA, id-daqs tal-effett li jista' jiġi skopert (eż. id-differenza sinifikanti minima).
- kwalunkwe stimolazzjoni ta' tkabbir misjuba fi kwalunkwe trattament.

▼ **M7**

- kwalunkwe sinjal viżiva tal-fitotossicità kif ukoll l-osservazzjonijiet tas-soluzzjonijiet tat-test.
- diskussjoni tar-riżultati, inkluż kwalunkwe influwenza fuq l-eżitu tat-test li tirriżulta mid-devjazzjonijiet minn dan il-metodu ta' ttestjar.

TAGHRIF

- (1) Il-Kapitolu C.26 ta' dan l-Anness: Lemna sp. Test tal-Inibizzjoni mit-Tkabbir,.
- (2) Il-Kapitolu C.3 ta' dan l-Anness: Alga tal-Ilma Helu u Ċjanobatterji, Test tal-Inibizzjoni tat-Tkabbir.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.
- (5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.
- (7) Il-Kapitolu C.50 ta' dan l-Anness: Sediment-free *Myriophyllum spicatum* Toxicity Test.
- (8) Il-Kapitolu C.28 ta' dan l-Anness: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.
- (11) OECD (2000), "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (16) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application" OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼ M7

- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼ **M7***Appendiċi 1***KOMPOŻIZZJONI TAL-MEDIUM SMART U BARKO**

Komponent	L-ammont ta' reaġent miżjud mal-ilma (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (ekwilibriju fl-arja)	7,9
(*) ilma demineralizzat (jiġifieri distillat jew dejonizzat)	

▼ **M7***Appendiċi 2***DEFINIZZJONIJIET**

Bijomassa hija l-piż frisk u/jew niexef ta' materja ħajja preżenti f'popolazzjoni. F'dan it-test il-bijomassa hija s-somma tar-rimja prinċipali, tal-fergħat laterali kollha u tal-għerūq kollha.

Sustanza kimika hija sustanza jew tahlita.

Klorożi hija l-bidla tal-kulur minn aħdar għal sfurija tal-organizmu tat-test speċjalment tas-sepali.

EC_x huwa l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test mahlula fil-medium tat-test li jirriżulta fi tnaqqis ta' x % (eż. 50 %) fit-tkabbir tal-*Myriophyllum spicatum* f'perjodu ta' esponiment ddikjarat (li għandu jissewma esplicitament jekk iwarja mid-durata tat-test shiħ jew normali). Biex tindika mingħajr ambigwità valur EC li jiġi derivat minn rata tat-tkabbir, is-simbolu "E_rC" jintuża għar-rata tat-tkabbir u "E_yC" jintuża għar-rendiment, segwit mill-varjabbli tal-kejl użat, eż. E_rC (tul tar-rimja prinċipali).

It-tkabbir huwa zieda fil-varjabbli tal-kejl, eż. tul tar-rimja prinċipali, l-ammont tal-fergħat laterali totali, it-tul tar-rimja totali, it-tul tal-għerūq totali, il-piż frisk, il-piż niexef jew in-numru ta' sepali matul il-perjodu tat-test.

Ir-rata tat-tkabbir (rata ta' tkabbir speċifika medja) hija z-zieda logaritmika fil-varjabbli tal-kejl waqt il-perjodu tal-esponiment. *Nota:* Il-varjabbli tar-rispons relatati mar-rata tat-tkabbir huma indipendenti mid-durata tat-test sakemm il-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi tal-kontroll mhux esposti huwa esponenzjali.

Il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) hija l-inqas konċentrazzjoni ttestjata li fiha s-sustanza kimika hija osservata li jkollha effett ta' tnaqqis statistikament sinifikanti fuq it-tkabbir ($b'p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll, f'hin ta' esponiment partikolari. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha oghla mil-LOEC għandu jkollhom effett ta' ħsara ugwali jew oghla minn dawk osservati fil-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jistgħux jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni dettaljata għal kif il-LOEC (u b'hekk in-NOEC) intgħazlet.

Varjabbli tal-kejl huma kwalunkwe tip ta' varjabbli li huma mkejla biex jesprimu l-punt tat-tmiem tat-test bl-użu ta' wiehed jew aktar varjabbli tar-rispons differenti. F'dan il-metodu ta' ttestjar it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-fergħat laterali totali, it-tul tar-rimja prinċipali, it-tul tal-għerūq totali, il-piż frisk, il-piż xott u n-numru ta' sepali huma varjabbli tal-kejl.

Monokultura hija kultura bi speċi ta' pjanta wahda.

Nekrozi huwa tessut mejjet (jiġifieri abjad jew kannella skur) tal-organizmu tat-test.

Il-Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) hija l-konċentrazzjoni tat-test eżattament taht l-LOEC.

Varjabbli tar-rispons huwa varjabbli għall-istima tat-tossicità derivata minn kwalunkwe varjabbli mkejja li jiddeskrivi l-bijomassa b'metodi differenti tal-kalkolu. Għal dan il-metodu ta' ttestjar, ir-rata tat-tkabbir u r-rendiment huma varjabbli tar-rispons derivati minn varjabbli tal-kejl bħat-tul tar-rimja prinċipali, tul tar-rimja totali, piż frisk, piż niexef jew numru ta' sepali.

Test semistatiku (tiġdid) huwa test fejn is-soluzzjoni tat-test tiġi sostitwita perjodikament f'intervalli speċifiċi matul it-test.

Test statiku huwa metodu ta' ttestjar mingħajr tiġdid tas-soluzzjoni tat-test matul it-test.

▼M7

Sustanza kimika tat-test hija kwalunkwe sustanza jew tahlita li tiġi ttestjata billi jintuza dan il-metodu ta' ttestjar

Punt ta' tmiem tat-test jiddeskrivi l-fattur ġenerali li jinbidel b'mod relattiv għall-kontroll mis-sustanza kimika tat-test bħala mira tat-test. F'dan il-metodu ta' ttestjar, il-punt ta' tmiem tal-ittestjar hija l-inibizzjoni li tista' tiġi espressa b'varjabbli ta' rispons differenti li huma bbażati fuq varjabbli ta' kejl wieħed jew iktar.

Medium tat-test huwa medium ta' tkabbir sintetiku komplut li fuqu jikbru l-pjanti tal-ittestjar meta esposti għas-sustanza kimika tat-test. Is-sustanza kimika tat-test tinhall fil-medium tat-test.

UVCB hija sustanza ta' kompożizzjoni mhux magħrufa jew varjabbli, prodott ta' reazzjoni kumplessa jew materjal bijoloġiku

Rendiment huwa l-valur ta' varjabbli ta' kejl biex tiġi espressa l-bijomassa fi tmiem il-perjodu ta' esponiment li minnu jitnaqqas il-varjabbli ta' kejl fil-bidu tal-perjodu ta' esponiment. *Nota:* Meta l-mudell tat-tkabbir ta' organiżmi mhux esposti huwa esponenzjali, il-varjabbli tar-rispons ibbażati fuq ir-rendiment se jonqsu matul id-durata tat-test.