



Kunsill
tal-Unjoni Ewropea

Brussell, 25 ta' Frar 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 2

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

NOTA TA' TRASMISSJONI

minn:	Kummissjoni Ewropea
data meta waslet:	22 ta' Frar 2019
lil:	Segretarjat Ġenerali tal-Kunsill
Nru dok. Cion:	Anness tar D060575/02
Sugġett:	Anness tar-REGOLAMENT TAL-KUMMISSJONI (UE) .../... ta' XXX li jemenda, għall-finijiet tal-adattament tiegħu għall-progress tekniku, l-Anness tar-Regolament (KE) Nru 440/2008 li jistabbilixxi metodi ta' ttestjar skont ir-Regolament (KE) Nru 1907/2006 tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill dwar ir-reġistrazzjoni, il-valutazzjoni, l-awtorizzazzjoni u r-restrizzjoni ta' sustanzi kimiċi (REACH)

Id-delegazzjonijiet għandhom isibu mehmuz id-dokument Anness tar D060575/02.

Mehmuz: Anness tar D060575/02

B.71 ASSAĠĠI *IN VITRO* DWAR IS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA LI JINDIRIZZA L-AVVENIMENT EWLIENI FL-AKTIVAZZJONI TAČ-ĊELLOLI DENDRITIČI FUQ IL-PERKORS TAL-EŻITU AVVERS (AOP) GĦAS-SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA

INTRODUZZJONI ĠENERALI

Attivazzjoni tal-metodu ta' ttestjar ibbażat fuq l-avveniment ewlieni tač-čelloli dendritiči

1. Sentizzatur tal-ġilda jirreferi għal sustanza li se twassal għal rispons allergiku wara kuntatt mal-ġilda kif definit mis-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiči tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU) (1) u mir-Regolament tal-Unjoni Ewropea (UE) 1272/2008 dwar il-Klassifikazzjoni, l-Ittikettar u l-Imballaġġ tas-Sustanzi u t-Taħlitiet (CLP)¹. Hemm qbil ġenerali dwar l-avvenimenti bijoloġiči ewlenin li jwasslu għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-għarfien kurrenti dwar il-mekkaniżmi kimiči u bijoloġiči assočjati mas-sensitizzazzjoni tal-ġilda ngabar fil-qosor bħala Perkors tal-Eżitu Avvers (AOP) skont il-programm tal-OECD dwar l-AOP (2), li jibda bl-avveniment ta' tnedija molekulari permezz, l-avvenimenti intermedji sal-effett avvers, jiġifieri dermatite ta' kuntatt allergiku. F'dan il-każ, l-avveniment ta' tnedija molekulari (jiġifieri l-ewwel avveniment ewlieni) hu l-irbit kovalenti tas-sustanzi elettrofiliči mač-čentri nukleofiliči fil-proteini tal-ġilda. It-tieni avveniment ewlieni f'dan l-AOP iseħħ fil-keratinočiti u jinkludi risponsi infjammatorji kif ukoll tibdiliet fl-espressjoni tal-ġeni assočjati mal-pekorsi tas-sinjalar tač-čelloli spečifiči bħall-perkorsi dipendenti fuq l-element ta' rispons tal-antiossidanti/elettrofili (ARE). It-tielet avveniment ewlieni hu l-attivazzjoni ta' čelloli dendritiči (DC), tipikament ivvalutata bl-espressjoni ta' markaturi tal-wičč tač-čelloli, ta' kemikini u ta' čitokini spečifiči. Ir-raba' avveniment ewlieni hu l-attivazzjoni u l-proliferazzjoni tač-čelloli-T, li hu vvalutat b'mod indirett fl-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali (LLNA) (3).
2. Dan il-metodu ta' ttestjar (TM) hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 442E tal-OECD (2017). Dan jiddeskrivi l-assaġġi *in vitro* li jindirizzaw il-mekkaniżmi deskritti taħt l-avveniment ewlieni fl-attivazzjoni tač-čelloli dendritiči tal-AOP għas-sensitizzazzjoni tal-

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

gilda (2). It-TM jinkludi testijiet li għandhom jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-gilda u dawk li mhumiex sensitizzaturi skont il-GHS tan-NU u s-CLP.

It-testijiet deskritti f'dan it-TM huma:

- It-Test tal-Attivazzjoni tal-Linji ta' Ċelloli Umani (h-CLAT)
 - It-Test ta' attivazzjoni tal-linja ta' ċelloli U937 (U-SENSTM)
 - L-Assaġġ tal-Ġene Indikatur Interleukin-8 (assaġġ IL-8 Luc)
3. It-testijiet inklużi f'dan il-metodu ta' ttestjar u fit-TG korrispondenti tal-OECD jistgħu jvarjaw b'rabta mal-proċedura użata biex jiġu generati d-*data* u r-riżultati mkejla iżda jistgħu jintużaw b'mod indiskriminat biex jindirizzaw ir-rekwiżiti tal-pajjiżi għar-riżultati tat-testijiet dwar l-Avveniment Ewlieni fuq l-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi tal-AOP għas-sensitizzazzjoni tal-gilda filwaqt li jittiehed benefiċċju mill-Aċċettazzjoni Reċiproka tad-*Data* tal-OECD.

Sfond u prinċipji tat-testijiet inklużi fil-metodu ta' ttestjar ibbażat fuq l-avvenimenti ewlenin

4. Normalment, il-valutazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-gilda kienet tinvolvi l-użu ta' annimali tal-laboratorju. Il-metodi klassiċi li jużaw fniek tal-indi, it-Test ta' Massimizzazzjoni tal-Fniek tal-Indi (GMPT) ta' Magnusson u ta' Kligman u t-Test Buehler (TM B.6) (4), jistudjaw kemm il-faži ta' induzzjoni kif ukoll il-faži ta' elicitazzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-gilda. It-testijiet murini, l-LLNA (TM B.42) (3) u ż-żewġ modifiki mhux radjoattivi tiegħu, LLNA: DA (TM B.50) (5) u LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), il-koll jivvalutaw ir-rispons tal-induzzjoni b'mod esklużiv, u ġew aċċettati wkoll peress li jagħtu vantaġġ fuq it-testijiet fuq il-ħnieżer tal-indi f'termini tat-trattament xieraq tal-annimali flimkien ma' kejl oġġettiv tal-faži ta' induzzjoni tas-sensitizzazzjoni tal-gilda.
5. Dan l-aħħar ġew adottati metodi ta' ttestjar *in chemico* u *in vitro* b'bażi mekkanistika li jindirizzaw l-ewwel avveniment ewlieni (TM B.59; l-Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi (7)), u t-tieni avveniment ewlieni (TM B.60; Metodu ta' Ttestjar tal-Luċiferażi ARE-Nrf2 (8)) tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-gilda għall-kontribuzzjoni għall-evalwazzjoni tal-potenzjal ta' periklu tas-sensitizzazzjoni tal-gilda tas-sustanzi kimiċi.
6. Testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar jew jikkwantifikaw it-tibdil fl-espressjoni tal-markatur(i) tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjat mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u d-DC wara l-esponiment għas-sensitizzaturi (eż. CD54, CD86) jew it-tibdiliet fl-espressjoni ta' IL-8, ċitokina assoċjata mal-attivazzjoni tad-DC. Is-sensitizzaturi tal-gilda ġew irrapportati li jinduċu l-espressjoni ta' markaturi tal-membrana taċ-ċelloli bħal CD40, CD54, CD80, CD83, u CD86 minbarra l-induzzjoni ta' ċitokini proinfjammatorji, bħal IL-

1 β u TNF- α , u diversi kemokini li jinkludu IL-8 (CXCL8) u CCL3 (9) (10) (11) (12), assoċjati mal-attivazzjoni tad-DC (2).

7. Madankollu, peress li l-attivazzjoni tad-DC tirrappreżenta biss avveniment ewlieni wieħed tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (2) (13), l-informazzjoni generata bit-testijiet li jkejlu l-markaturi tal-attivazzjoni tad-DC waħedha jaf ma tkunx biżżejjed biex tinħareġ konklużjoni dwar il-preżenza jew l-assenza tal-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Għaldaqstant, id-*data* generata bit-testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar hi proposta biex issostni d-diskriminazzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) u dawh li mhumiex sensitizzaturi meta jintużaw fi hdan Approċċi Integrati għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni (IATA), flimkien ma' informazzjoni komplimentari rilevanti oħra, eż. derivata minn assaġġi *in vitro* li jindirizzaw avvenimenti ewlenin oħra tal-AOP tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda kif ukoll metodi mhux tal-ittestjar, li jinkludu read-across minn analogi kimiċi (13). Eżempji tal-użu tad-*data* generata b'dawn it-testijiet fi hdan l-Approċċi Definiti, jiġifieri approċċi standardizzati kemm b'rabta mas-sett ta' sorsi ta' informazzjoni użati kif ukoll fil-proċedura applikata għad-*data* biex jinkiseb it-tbassir, ġew ippubblikati (13) u jistgħu jithaddmu bħala elementi siewja fi hdan IATA.
8. It-testijiet deskritti f'dan il-metodu ta' ttestjar ma jistgħux jintużaw waħedhom, u lanqas biex jissubkategorizzaw is-sensitizzaturi tal-ġilda fis-subkategoriji 1A u 1B kif definiti mill-GHS/mis-CLP tan-NU, għall-awtoritajiet li jimplimentaw dawn iż-żewġ subkategoriji fakultattivi, u lanqas biex titbassar il-potenza għal deċiżjonijiet dwar il-valutazzjonijiet tas-sikurezza. Madankollu, skont il-qafas regolatorju, riżultati pożittivi generati b'dawn il-metodi jistgħu jintużaw waħedhom biex jikklassifikaw sustanza kimika fil-kategorija 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP.
9. It-terminu “sustanza kimika tat-test” jintuża f'dan il-metodu ta' ttestjar biex jirreferi għal dak li jkun qed jiġi ttestjat¹ u mhux b'rabta mal-applikabbiltà tat-testijiet għall-ittestjar ta' sustanzi monokostitwenti, ta' sustanzi multikostitwenti u/jew ta' taħlitiet. Bhalissa hemm disponibbli informazzjoni limitata dwar l-applikabbiltà tat-testijiet għal sustanzi/taħlitiet multikostitwenti (14) (15). It-testijiet xorta waħda huma teknikament applikabbli għall-ittestjar ta' sustanzi multikostitwenti u taħlitiet. Madankollu, qabel ma jintuża dan il-

¹ F'Gunju 2013, il-Laqqha Kongunta tal-OECD qablet li, fejn possibbli, għandu jiġi applikat użu aktar konsistenti tat-terminu “sustanza kimika tat-test” li jiddeskrivi dak li jkun qed jiġi ttestjat f'linji gwida tat-test godda u aġġornati tal-OECD.

metodu ta' ttestjar fuq tahlita għall-generazzjoni ta' *data* għal skop regolatorju intiż, għandu jiġi kkunsidrat jekk jistax jipprovdi riżultati adegwati għal dak l-għan u, jekk iva, għaliex¹. Dawn il-kunsiderazzjonijiet mhumiex meħtieġa meta jkun hemm rekwiżit regolatorju għall-ittestjar tat-tahlita. Barra minn hekk, meta jiġu ttestjati sustanzi multikostitwenti jew taħlitiet, għandha tingħata kunsiderazzjoni lill-interferenza possibbli tal-kostitwenti ċitotissiċi bir-risponsi osservati.

¹ Din is-sentenza ġiet proposta u maqbula fil-laqgħa ta' April 2014 tad-WNT.

DOKUMENTAZZJONI

- (1) In-Nazzjonijiet Uniti (2015) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.
- (2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Il-Kapitolu B.42 ta' dan l-Anness: L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali. Il-Kapitolu B.6 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda.
- (4) Il-Kapitolu B.50 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda. L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali. DA.
- (5) Il-Kapitolu B.51 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda. L-Assaġġ tal-Linfonodi Lokali. BrdU-ELISA.
- (6) Il-Kapitolu B.59 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda In Chemico: Assaġġ Dirett tar-Reattività tal-Peptidi (DPRA).
- (7) Il-Kapitolu B.60 ta' dan l-Anness: Sensitizzazzjoni tal-Ġilda *In Vitro*: Metodu ta' Ttestjar tal-Luċiferażi ARE-Nrf2.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, u Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, u Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, u Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 u Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

Appendiċi 1

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TAL-ATTIVAZZJONI TAL-LINJI TA' ĊELLOLI UMANI (H-CLAT)

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. L-h-CLAT jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjati mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u taċ-ċelloli dendritiċi (DC) (jiġifieri CD86 u CD54), fil-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana THP-1, wara esponiment għas-sensitizzaturi (1)(2). Il-livelli ta' espressjoni mkejla tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 u tas-CD54 imbagħad jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.
2. L-h-CLAT ġie evalwat fi studju ta' validazzjoni koordinat mil-Laboratorju ta' Referenza tal-Unjoni Ewropea għal Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Animali (EURL ECAAM) u f'rieżami bejn il-pari indipendenti sussegwenti mill-Kumitat Konsultattiv Xjentifiku tal-EURL ECVAM (ESAC). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, l-h-CLAT kien rakkomandat mill-EURL ECVAM (3) biex jintuża bħala parti minn IATA b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini tal-klassifikazzjoni u tat-tikkettar tal-perikli. Eżempji tal-użu tad-*data* tal-h-CLAT flimkien ma' informazzjoni oħra huma rrapportati fid-dokumentazzjoni (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).
3. L-h-CLAT wera li kien trasferibbli għal-laboratorji esperjenzati f'tekniki tal-koltura taċ-ċelloli u fl-analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss. Il-livell ta' riproducibbiltà fil-previżjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mit-test hu fl-ordni ta' 80 % fi hdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji (3)(12). Ir-riżultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (13) u fi studji ppubblikati oħra (14) b'mod ġenerali jindikaw li, meta mqabbla mar-riżultati tal-LLNA, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 85 % (N=142) b'sensittività ta' 93 % (94/101) u bi speċifiċità ta' 66 % (27/41) (fuq il-bażi ta' analiżi mill-ġdid minn EURL ECVAM (12) b'kunsiderazzjoni tad-*data* eżistenti kollha u mingħajr ma jiġu kkunsidrati r-riżultati negattivi għal sustanzi kimiċi b'Log Kow akbar minn 3,5 kif deskritt fil-paragrafu (4). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz bl-h-CLAT għandhom probabbiltà akbar li jikkonċernaw sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (4)(13)(15). Mehuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tal-metodu h-CLAT biex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Madankollu, il-valuri tal-akkuratezza mogħtija hawnhekk għall-h-CLAT bħala test waħdu huma indikattivi biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li l-metodu h-CLAT hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' mekkanizmi ta' reazzjoni, ta' potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u ta' proprjetajiet fiżikokimiċi (3)(14)(15). Il-metodu tal-h-CLAT hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli jew li jiffurmaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojde jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tistabbilixxix ruħha u lanqas ma tissepama mis-solvent/mill-veikolu f'fażijiet differenti) f'solvent/veikolu xieraq (ara l-paragrafu 14). Is-sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 għandhom tendenza li jipproduċu riżultati negattivi foloz (14). Għaldaqstant, riżultati negattivi b'sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 ma għandhomx jiġu kkunsidrati. Madankollu, riżultati pożittivi miksuba b'sustanzi kimiċi tat-test b'Log Kow akbar minn 3,5 xorta waħda jistgħu jintużaw biex isostnu l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala sensitizzatur tal-ġilda. Barra minn hekk, minhabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli użata (16) u minhabba l-kundizzjonijiet tal-esperiment, proapteni (jiġifieri sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju enzimi P450) u preapteni (jiġifieri sustanzi attivati b'ossidazzjoni) b'mod partikolari dawk b'rata baxxa ta' ossidazzjoni jistgħu jipprovdu riżultati negattivi wkoll fl-h-CLAT (15). Is-sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti jistgħu jiġu vvalutati bl-h-CLAT (17), iżda sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom li jehilsu l-istess tul ta' mewġa bħal istjoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) jew bħala jodur tal-propidju (PI), jinterferixxu mad-detezzjoni ċitometrika tal-fluss u b'hekk ma jistgħux jiġu evalwati kif suppost bl-użu ta' antikorpi konjugati tal-FITC jew bl-użu tal-PI. F'każ bħal dan, antikorpi oħra taggjati bil-fluworokromu jew markaturi oħra taċ-ċitotossicità, rispettivament, jistgħu jintużaw dment li jkun jista' jintwera li jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi taggjati bl-FITC (ara l-paragrafu 24) jew il-PI (ara l-paragrafu 18), eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1-2. Fid-dawl ta' dan ta' hawn fuq, riżultati negattivi għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet iddikjarati u flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fi hdan il-kuntest tal-IATA. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tal-metodu h-CLAT għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, dan ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.
5. Kif deskritt aktar 'il fuq, il-metodu h-CLAT isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Madankollu, għandu l-potenzjal li

jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni (4)(5)(9) ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA. Minkejja dan, hemm bżonn li jsir aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' *data* mill-bniedem, biex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tal-h-CLAT jistgħu jinformaw valutazzjoni tal-potenza.

6. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 1.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. Il-metodu h-CLAT hu assaġġ *in vitro* li jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli (jiġifieri CD86 u CD54) fuq linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana, iċ-ċelloli THP-1, wara esponiment għal 24 siegħa għas-sustanza kimika tat-test. Dawn il-molekuli tas-superfiċje huma markaturi tipiċi ta' attivazzjoni tat-THP-1 monoċitika u jistgħu jimitaw attivazzjoni tad-DC, li taqdi rwol kritiku fil-priming taċ-ċellola-T. It-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje jitkejlu b'ċitometrija tal-fluss wara tilwin taċ-ċelloli b'antikorpi taggjati bil-fluorokromu. Il-kejl taċ-ċitotossicità jsir fl-istess hin ukoll biex jiġi vvalutat jekk s-sovraregolazzjoni tal-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje sseħħx f'konċentrazzjonijiet subċitotossici. L-intensità relattiva tal-fluorexxenza tal-markaturi tas-superfiċje mqabbla mal-kontroll b'solvent/b'veikolu hi kkalkolata u tintuża fil-mudell tat-tbassir (ara l-paragrafu 26), b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

8. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 1.2. Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* generata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 11) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 20-22), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROĊEDURA

9. Dan it-test hu bbażat fuq il-protokoll nru 158 (18) tal-h-CLAT DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) li jirrappreżenta l-protokoll użat għall-istudju ta' validazzjoni koordinat mill-EURL ECVAM. Hu rakkomandat li dan il-protokoll jintuża meta jiġi implimentat u jintuża l-metodu h-CLAT fil-laboratorju. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin għall-metodu h-CLAT, li jinvolvi żewġ stadji: *assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* u *kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54*.

Thejjija tač-ċelloli

10. Il-linja ta' ċelloli tal-lewkinja monoċitika umana, THP-1, għandha tintuża għat-twettiq tal-metodu h-CLAT. Hu rakkomandat li ċ-ċelloli (TIB-202™) jinkisbu minn bank tač-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection.
11. Ič-ċelloli THP-1 huma kulturati f'37°C f'5 % CO₂ u atmosfera umidifikata f'medium RPMI-1640 supplimentat b'10 % serum bovin fetali (FBS), 0,05 mM 2-merkaptotanol, 100 unità/ml peniċillina u 100 µg/ml streptomina. L-użu tal-peniċilina u tal-istreptomina fil-medium tat-tkabbir jista' jiġi evitat. Madankollu, f'każ bħal dan l-utenti għandhom jivverifikaw li l-assenza ta' antibijotiċi fil-medium tat-tkabbir ma jkollha ebda impatt fuq ir-riżultati, pereżempju billi jittestjaw is-sustanzi ta' profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 1.2. Fi kwalunkwe każ, biex jimminimizzaw ir-riskju ta' kontaminazzjoni, għandhom jiġu segwiti Prattiki tajbin tal-kultura tač-ċellola indipendentement mill-preżenza jew mill-assenza ta' antibijotiċi fil-medium tat-tkabbir tač-ċelloli. Ič-ċelloli THP-1 jinżerġu bħala rutina kull jumejn/tlieta bid-densità ta' 0,1 sa $0,2 \times 10^6$ ċelloli/ml. Dawn għandhom jinżammu f'densitajiet minn 0,1 sa $1,0 \times 10^6$ ċelloli/ml. Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, ič-ċelloli għandhom jiġu kwalifikati billi jsir kontroll tar-reattività. Il-kontroll tar-reattività tač-ċelloli għandu jsir bl-użu tal-kontrolli pożittivi, it-2,4-dinitroklorobenżen (DNCB) (Nru CAS 97-00-7, ≥ 99 % purità) u s-sulfat tan-nikil (NiSO₄) (Nru CAS 10101-97-0, ≥ 99 % purità) u tal-kontroll negattiv, l-aċidu lattiku (LA) (Nru CAS 50-21-5, ≥ 85 % purità), ġimagħtejn wara li jinħallu. Kemm id-DNCB kif ukoll l-NiSO₄ għandhom jipproduċu rispons pożittiv tal-markaturi tas-superfiċje tač-ċelloli CD86 kif ukoll CD54, u l-LA għandu jipproduċi rispons negattiv tal-markaturi tas-superfiċje tač-ċelloli CD86 kif ukoll CD54. Huma biss ič-ċelloli li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività li jintużaw għall-assaġġ. Ič-ċelloli jistghu jiġu propagati sa xahrejn wara li jinħallu. In-numru tal-passaġġ ma għandux jaqbeż it-30. Il-kontroll tar-reattività għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 20-24.
12. Għall-ittestjar, ič-ċelloli THP-1 jinżerġu f'densità ta' $0,1 \times 10^6$ ċelloli/ml jew ta' $0,2 \times 10^6$ ċelloli/ml, u jiġu prekulturati fi flasks tal-kultura għal 72 siegħa jew għal 48 siegħa, rispettivament. Importanti li d-densità tač-ċelloli fil-flask tal-kultura eżatt wara l-perjodu ta' qabel il-kultura tkun konsistenti kemm jista' jkun f'kull esperiment (billi tintuża waħda miż-żewġ kundizzjonijiet ta' prekultura deskritti hawn fuq), għaliex id-densità tač-ċelloli fil-flask tal-kultura eżatt wara l-prekultura tista' taffettwa l-espressjoni ta' CD86/CD54 indotta minn allergeni (19). Fil-jum tal-ittestjar, ič-ċelloli miġbura mill-flask tal-kultura jerġġu jiġu sospizi b'medium tat-tkabbir frisk f' 2×10^6 ċelloli/ml. Imbagħad, ič-ċelloli jiġu distribwiti fi pjastra b'qiegħ ċatt b'24 bwejra b'500 µl (1×10^6 ċelloli/well) jew fi pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra bi 80 µl ($1,6 \times 10^5$ ċelloli/bwejra).

Assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża

13. *Assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* jsir għad-determinazzjoni tas-CV75, li hi l-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li tirriżulta f'vijabbiltà ta' 75 % taċ-ċelloli meta mqabbla mal-kontroll b'solvent/b'veikolu. Il-valur tas-CV75 jintuża biex tiġi determinata l-konċentrazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test għall-kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54 (ara l-paragrafi 20-24).

Thejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

14. Is-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jithejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-metodu h-CLAT, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew dispersi b'mod stabbli (ara wkoll il-paragrafu 4) f'salina jew f'medium bħala l-ewwel għażliet ta' solvent/veikolu jew f'sulfossidu tad-dimetil (DMSO, ≥ 99 % purità) bħala t-tieni għażla ta' solvent/veikolu jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli jew ma tifformax dispersjoni stabbli fiż-żewġ solventi/veikoli preċedenti, għal konċentrazzjonijiet finali ta' 100 mg/ml (f'salina jew f'medium) jew ta' 500 mg/ml (f'DMSO). Solventi/veikoli oħra li mhumex daww deskritti hawn fuq jistgħu jintużaw jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti. L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-veikolu finali għandha tiġi kkunsidrata.
15. Mis-soluzzjonijiet ewlenin ta' 100 mg/ml (f'salina jew f'medium) jew ta' 500 mg/ml (f'DMSO) tas-sustanzi kimiċi tat-test, għandhom jitwettqu l-passi ta' dilwizzjoni li ġejjin:
- Għas-salina jew għall-medium bħala solvent/veikolu: Jithejjew tmien soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet), b'dilwizzjonijiet serjali ta' darbtejn bl-użu tas-solvent/veikolu korrispondenti. Dawn is-soluzzjonijiet ewlenin ikomplu jiġu dilwiti 50 darba f'medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Jekk l-ogħla konċentrazzjoni finali fil-pjastra ta' 1000 µg/ml ma tkunx tossika, il-konċentrazzjoni massima għandha terġa' tiġi determinata billi jsir test ġdid taċ-ċitotossicità. Il-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5000 µg/ml għal sustanzi kimiċi tat-test dissolti jew dispersi b'mod stabbli f'salina jew f'medium.
 - Għal DMSO bħala solvent/veikolu. Jithejjew tmien soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet), b'dilwizzjonijiet serjali ta' darbtejn bl-użu tas-solvent/veikolu korrispondenti. Dawn is-soluzzjonijiet ewlenin ikomplu jiġu dilwiti 250 darba f'medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Il-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż l-1000 µg/ml anki jekk din il-konċentrazzjoni ma tkunx tossika.

Is-soluzzjonijiet għall-użu finalment jintużaw għall-esponiment billi jiżdied volum ugwali ta' soluzzjoni għall-użu fil-volum tas-sospensjoni taċ-ċelloli THP-1 fil-pjastra (ara wkoll il-paragrafu 17) biex tinkiseb dilwizzjoni ulterjuri ta' darbtejn (normalment, il-medda finali tal-konċentrazzjonijiet fil-pjastra tkun ta' 7,81–1000 µg/ml).

16. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu użat fil-metodu h-CLAT hu l-medium tat-tkabbir (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli (ara l-paragrafu 4)

b'medium jew b'salina) jew DMSO (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli f'DMSO) ittestjat f'koncentrazzjoni finali waħda fil-pjastra ta' 0,2 %. Dan issirlu l-istess dilwizzjoni bħal dik deskritta għas-soluzzjonijiet għall-użu fil-paragrafu 15.

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Il-medium tat-tkabbir jew is-soluzzjonijiet għall-użu deskritti fil-paragrafi 15 u 16 jithalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mhejjija fil-pjastra b'qiegħ ċatt b'24 bwejra jew b'96 bwejra (ara l-paragrafu 12). Imbagħad il-pjastri trattati jiġu inkubati għal $24 \pm 0,5$ siegħa f' 37°C f'5 % CO_2 . Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastra tiġi ssigillata qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test (20).

Tilwin bil-jodur tal-propidju (PI)

18. Wara esponiment għal $24 \pm 0,5$ siegħa, iċ-ċelloli jiġu trasferiti f'tubi tal-kampjun u jingabru b'ċentfigurazzjoni. Is-supernatanti jintremew u iċ-ċelloli li jifdal jiġu sospizi mill-ġdid b'200 μl (fil-każ ta' 96 bwejra) jew b'600 μl (fil-każ ta' 24 bwejra) salina baferjata bil-fosfat li jkun fiha 0,1 % albumina tas-serum tal-bovini (bafer tat-tilwin). 200 μl sospensjoni taċ-ċelloli tiġi trasferita fi pjastra b'qiegħ għat-tond b'96 bwejra (fil-każ ta' 96 bwejra) jew f'mikrotubu (fil-każ ta' 24 bwejra) u tinħasel darbtejn b'200 μl (fil-każ ta' 96 bwejra) jew b'600 μl (fil-każ ta' 24 bwejra) ta' bafer tat-tilwin. Finalment, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospizi f'bafer tat-tilwin (eż. 400 μl) u tiżdied soluzzjoni tal-PI (eż. 20 μl) (pereżempju l-koncentrazzjoni finali tal-PI tkun ta' 0,625 $\mu\text{g/ml}$). Jistgħu jintużaw markaturi oħra taċ-ċitotossicità, bħal 7-Amminoactinomicina D (7-AAD), Tripan blu jew oħrajn jekk it-tilwin alternattiv ikun jista' jintwera li jipprovdi riżultati simili bħall-PI, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1.2.

Kejl taċ-ċitotossicità b'ċitometrija tal-flus u bi stima tal-valur tas-CV75

19. It-tehid tal-PI jiġi analizzat bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss bil-kanal ta' akkwizzizzjoni FL-3. B'kollox jinkisbu 10 000 ċellola ħajja (negattivi għall-PI). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tista' tiġi kkalkolata bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja mill-programm ta' analiżi taċ-ċitometru. Meta l-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun baxxa, għandhom jinkisbu sa 30 000 ċellola inklużi iċ-ċelloli mejtin. Inkella, id-data tista' tinkiseb għal minuta waħda wara t-tnedija tal-analiżi.

$$\text{Vijabbiltà taċ-ċelloli} = \frac{\text{Numru ta' ċelloli ħajjin}}{\text{Numru totali ta' ċelloli miksuba}} \times 100$$

Il-valur tas-CV75 (ara l-paragrafu 13), jiġifieri konċentrazzjoni li turi 75 % tas-sopravivenza taċ-ċelloli THP-1 (ċitotossicità ta' 25 %), jiġi kkalkolat b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

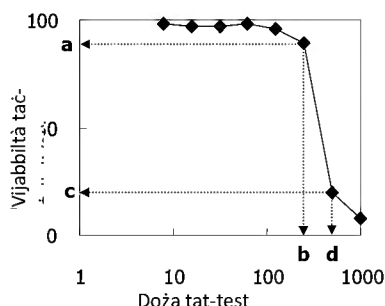
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Fejn:

a hu l-valur minimu tal-vijabbiltà tač-čelloli oghla minn 75 %

c hu l-valur massimu tal-vijabbiltà tač-čelloli anqas minn 75 %

b u d huma l-konċentrazzjonijiet li juru l-valur tal-vijabbiltà tač-čelloli a u c rispettivament



Jistgħu jintużaw approċċi oħra biex tinkiseb is-CV75 dment li jintwera li dawn ma jkollhom ebda impatt fuq ir-riżultati (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza).

Kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54

Thejjija tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

20. Is-solvent/il-veikolu xieraq (salina, medium jew DMSO; ara l-paragrafu 14) jintuża biex jiddisolvja jew jiddispersa b'mod stabbli is-sustanzi kimiċi tat-test. Is-sustanzi kimiċi tat-test l-ewwel jiġu dilwiti għall-konċentrazzjoni li tikkorrispondi għall-100 darba (għas-salina jew għall-medium) jew għall-500 darba (għal DMSO) tal- $1,2 \times \text{CV75}$ determinata fl-assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża (ara l-paragrafu 19). Jekk is-CV75 ma tkunx tista' tiġi determinata (jiġifieri ma tiġix osservata ċitotossicità suffiċjenti fl-assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża), l-ogħla konċentrazzjoni solubbli jew dispersa stabbliment tas-sustanza kimika tat-test m'hejjija b'kull solvent/veikolu għandha tintuża bħala l-konċentrazzjoni tat-tluq. Jekk jogħġbok kun af li l-konċentrazzjoni finali fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5000 µg/ml (fil-każ ta' salina jew ta' medium) jew l-1000 µg/ml (fil-każ ta' DMSO). Imbagħad isiru dilwizzjonijiet serjali ta' 1,2 darbiet bl-użu tas-solvent/tal-veikolu korrispondenti biex jinkisbu s-soluzzjonijiet ewlenin (tmien konċentrazzjonijiet li jvarjaw minn $100 \times 1,2 \times \text{CV75}$ sa $100 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (għas-salina jew għall-medium) jew minn $500 \times 1,2 \times \text{CV75}$ sa $500 \times 0,335 \times \text{CV75}$ (għal DMSO)) li għandhom jiġu ttestjati fil-metodu h-CLAT (ara l-protokoll DB-ALM Nru 158 għal eżempju tal-iskema ta' dożaġġ). Imbagħad, is-soluzzjonijiet ewlenin jiġu dilwiti aktar għal 50 darba (għas-salina jew għall-medium) jew għal 250 darba (għal DMSO) fil-medium tat-tkabbir (soluzzjonijiet għall-użu). Dawn is-soluzzjonijiet huma daww finalment użati għall-esponiment b'fattur finali ulterjuri ta' dilwizzjonijiet għal darbtejn fil-pjastra. Jekk ir-riżultati ma jissodisfawx il-

kriterji ta' aċċettazzjoni deskritti fil-paragrafi 29 u 30 rigward il-vijabbiltà taċ-ċelloli, l-*assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża* jista' jerga' jsir biex tiġi determinata CV75 aktar preċiża. Jekk jogħġbok kun af li pjastri b'24 bwejra biss jistgħu jintużaw għall-kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54.

21. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu jithejja kif deskritt fil-paragrafu 16. Il-kontroll pożittiv użat fil-metodu h-CLAT hu DNCB (ara l-paragrafu 11), li għalih jithejjew soluzzjonijiet ewlenin f'DMSO u jiġu dilwiti kif deskritt għas-soluzzjonijiet ewlenin fil-paragrafu 20. DNCB għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv għall-*kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54* f'konċentrazzjoni waħda finali fil-pjastra (tipikament 4,0 µg/ml). Biex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 4,0 µg/ml ta' DNCB fil-pjastra, tithejja soluzzjoni ewlenija ta' 2 mg/ml ta' DNCB f'DMSO u tkompli tiġi dilwita għal 250 darba b'medium tat-tkabbir għal soluzzjoni għall-użu ta' 8 µg/ml. Inkella, is-CV75 ta' DNCB, li tiġi determinata f'kull faċilità tat-test, tista' tintuża wkoll bħala l-konċentrazzjoni tal-kontroll pożittiv. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli. Għal kontrolli pożittivi, il-konċentrazzjoni finali waħda fil-pjastra ma għandhiex taqbeż il-5000 µg/ml (fil-każ ta' salina jew ta' medium) jew l-1000 µg/ml (fil-każ ta' DMSO). Il-kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjoni huma l-istess bħal dawk deskritti għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 29), hliel għall-aħħar kriterju ta' aċċettazzjoni peress li l-kontroll pożittiv jiġi ttestjat f'konċentrazzjoni waħda.

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

22. Għal kull sustanza kimika tat-test u sustanza tal-kontroll, hu meħtieġ esperiment wiehed biex tinkiseb previżjoni. Kull esperiment jikkonsisti f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti għall-*kejl tal-espressjoni ta' CD86/CD54* (ara l-paragrafu 26-28). Kull sessjoni indipendenti ssir f'jum differenti jew fl-istess jum dment li għal kull sessjoni: a) jithejjew soluzzjonijiet ewlenin u soluzzjonijiet użati friski indipendenti tas-sustanza kimika tat-test u tas-soluzzjonijiet tal-antikorpi u b) jintużaw ċelloli miġbura indipendentement (jiġifieri ċ-ċelloli jridu jingabru minn flasks tal-koltura differenti); madankollu, iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ. Sustanzi kimiċi tat-test u sustanzi tal-kontroll imhejjija bħala soluzzjonijiet għall-użu (500 µl) jithalltu ma' 500 µl ta' ċelloli sospiżi (1×10^6 ċelloli) fi proporzjon ta' 1:1, u ċ-ċelloli jiġu inkubati għal $24 \pm 0,5$ siegħa kif deskritt fil-paragrafi 20 u 21. F'kull sessjoni, replika waħda għal kull konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test u tas-sustanza tal-kontroll hi biżżejjed għaliex tbassir jinkiseb minn tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti.

It-tilwin u l-analiżi taċ-ċelloli

23. Wara $24 \pm 0,5$ siegħa ta' esponiment, iċ-ċelloli jiġu trasferiti minn pjastra b'24 bwejra f'tubi tal-kampjun, jingabru b'ċentrifugrazzjoni u mbagħad jinħaslu darbtejn b'1 ml ta' bafer tat-

tilwin (jekk ikun hemm b'zonn jistgħu jitwettqu passi addizzjonali tal-ħasil). Wara l-ħasil, iċ-ċelloli jiġu mblokkati b'600 µl soluzzjoni tal-imblokkar (bafer tat-tilwin li fih 0,01 % (w/v) globulina (frazzjoni ta' Cohn II, III, umana; SIGMA, #G2388-10G jew ekwivalenti)) u inkubati f'4°C għal 15-il min. Wara l-imblokkar, iċ-ċelloli jinqasmu fi tliet alikwoti ta' 180 µl fi pjastra b'qiegħ fit-tond b'96 bwejra jew f'mikrotubu.

24. Wara ċ-ċentrifugrazzjoni, iċ-ċelloli jitlewnu b'50 µl ta' antikorpi anti-CD86, anti-CD54 jew IgG1 tal-ġrieden (isotip) tikkettati bl-FITC f'4°C għal 30 min. L-antikorpi deskritti fil-protokoll h-CLAT DB-ALM nru 158 (18) għandhom jintużaw b'dilwizzjoni ta' 3:25 v/v (għas-CD86 (BD-PharMingen, #555657; Klonu: Fun-1)) jew ta' 3:50 v/v (għas-CD54 (DAKO, #F7143; Klonu: 6,5B5) u IgG1 (DAKO, #X0927)) b'bafer tat-tilwin. Dawn il-fatturi ta' dilwizzjoni tal-antikorpi ġew definiti mill-iżviluppaturi tat-testijiet bħala dawk li jipprovdu l-aħjar proporzjon minn sinjal għal storbu. Fuq il-bażi tal-esperjenza tal-iżviluppaturi tat-test, l-intensità tal-fluworessenza tal-antikorpi normalment tkun konsistenti bejn lottijiet differenti. Madankollu, l-utenti jistgħu jikkunsidraw it-titrazzjoni tal-antikorpi fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju tagħhom stess biex jiddefinixxu l-aħjar konċentrazzjonijiet għall-użu. Antikorpi anti-CD86 u/jew anti-CD54 ohra taggjati bil-fluworokromu jistgħu jintużaw jekk jista' jintwera li dawn jipprovdu riżultati simili bħall-antikorpi konjugati bl-FITC, pereżempju bl-ittejtjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 1.2. Ta' min jinnota li t-tibdil tal-klonu jew tal-fornitur tal-antikorpi kif deskritt fil-protokoll h-CLAT DB-ALM nru 158 (18) jista' jaffettwa r-riżultati. Wara l-ħasil darbejn jew aktar b'150 µl bafer tat-tilwin, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'bafer tat-tilwin (eż. 400 µl), u tiżdied is-soluzzjoni tal-PI (eż. 20 µl biex tinkiseb konċentrazzjoni finali ta' 0,625 µg/ml) jew soluzzjoni ta' markatur ieħor taċ-ċitotossiċità (ara l-paragrafu 18). Il-livelli ta' espressjoni tas-CD86 u tas-CD54, u l-vijabbiltà taċ-ċelloli, jiġu analizzati bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-data

25. L-espressjoni tas-CD86 u tas-CD54 tiġi analizzat bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss bil-kanal ta' akkwizzizzjoni FL-1. Fuq il-bażi tal-intensità ġeometrika medja tal-fluworessenza (MFI), l-intensità relattiva tal-fluworessenza (RFI) tas-CD86 u tas-CD54 għaċ-ċelloli tal-kontroll pożittiv (ctrl) u trattati bis-sustanza kimika tiġi kkalkolata skont l-ekwazzjoni li ġejja:

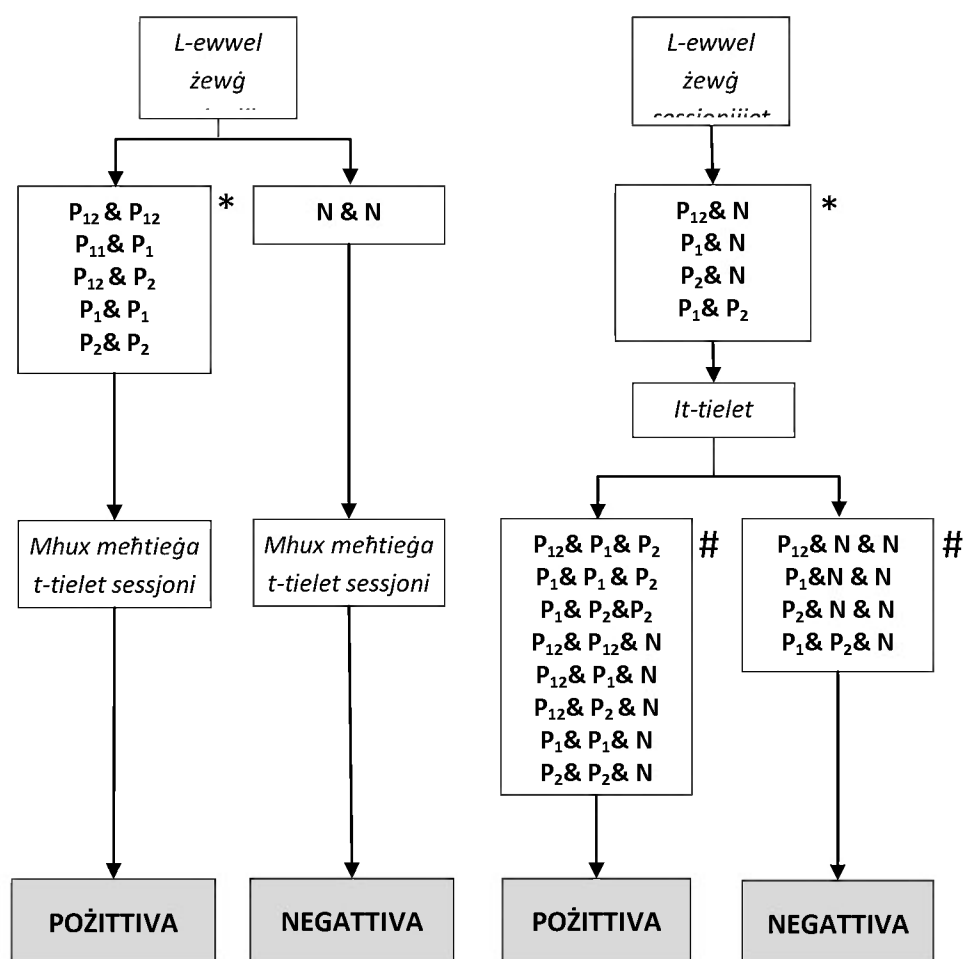
$$RFI = \frac{MFI \text{ taċ-ċellola trattata kimikament} - MFI \text{ taċ-ċelloli ta' kontroll bl-isotip trattati kimikament}}{MFI \text{ taċ-ċelloli ctrl trattati b'solvent/b'veikolu} - MFI \text{ taċ-ċelloli ctrl bl-isotip trattati b'solvent/b'veikolu}} \times 100$$

Il-vijabbiltà taċ-ċelloli miċ-ċelloli tal-kontroll bl-isotip (ctrl) (li jitlewnu b'antikorpi tal-IgG1 tal-ġrieden (isotip)) tiġi kkalkolata wkoll skont l-ekwazzjoni deskritta fil-paragrafu 19.

Mudell ta' tbassir

26. Għall-kejl tal-espressjoni ta' *CD86/CD54*, kull sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti biex jinkiseb tbassir wiehed (POŻITTIV jew NEGATTIV). Tbassir h-CLAT jitqies POŻITTIV jekk tal-anqas tiġi ssodisfata waħda mill-kundizzjonijiet li ġejjin fi 2 minn 2 sessjonijiet indipendenti jew f'tal-anqas 2 minn 3, inkella t-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV (Figura 1):
 - L-RFI tas-CD86 tkun daqs jew akbar minn 150 % fi kwalunkwe konċentrazzjoni ttestjata (b'vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 50 %);
 - L-RFI tas-CD54 tkun daqs jew akbar minn 200 % fi kwalunkwe konċentrazzjoni ttestjata (b'vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 50 %).
27. Fuq il-bażi ta' dan li ntqal hawn fuq, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu pożittivi għas-CD86 u/jew it-tnejn ikunu pożittivi għas-CD54, it-tbassir h-CLAT jitqies POŻITTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. B'mod simili, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet ikunu negattivi għaž-żewġ markaturi, it-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV (b'kunsiderazzjoni dovuta tad-dispożizzjonijiet tal-paragrafu 30) mingħajr il-bżonn tat-tielet sessjoni. Madankollu, jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet ma jkunux jaqblu għal tal-anqas wiehed mill-markaturi (CD54 jew CD86), ikun hemm bżonn tat-tielet sessjoni u t-tbassir finali jkun ibbażat fuq ir-riżultat tal-maġġoranza tat-tliet sessjonijiet individwali (jiġifieri 2 minn 3). F'dan ir-rigward, ta' min jinnota li jekk isiru żewġ sessjonijiet indipendenti u waħda minnhom biss tkun pożittiva għas-CD86 (minn hawn 'il quddiem imsejha P_1) u l-oħra tkun pożittiva biss għas-CD54 (minn hawn 'il quddiem imsejha P_2), ikun hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni. Jekk din it-tielet sessjoni tkun negattiva għaž-żewġ markaturi (minn hawn 'il quddiem imsejha N), it-tbassir h-CLAT jitqies NEGATTIV. Min-naħa l-oħra, jekk it-tielet sessjoni tkun pożittiva għal wiehed mill-markaturi (P_1 jew P_2) jew għaž-żewġ markaturi (minn hawn 'il quddiem imsejha P_{12}), t

Figura 1: Mudell tat-tbassir użat fil-metodu h-CLAT. Tbassir h-CLAT għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjoni tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali.



P1: sessjoni b'CD86 pożittiv biss; P2: sessjoni b'CD54 pożittiv biss; P12: sessjoni b'CD86 kif ukoll CD54 pożittivi; N: sessjoni minghajr CD86 u CD54 pożittivi.

*Il-kaxex juru t-tahlitiet rilevanti tar-riżultati mill-ewwel żewġ sessjonijiet, indipendentement mill-ordni li fiha jistgħu jinkisbu.

#Il-kaxex juru t-tahlitiet rilevanti ta' riżultati mit-tliet sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel żewġ sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq, iżda ma jirriflettux l-ordni li fiha jistgħu jinkisbu.

28. Għas-sustanzi kimiċi tat-test imbassra bħala POŻITTIVI bl-h-CLAT, b'mod fakultattiv jistgħu jiġu determinati żewġ valuri tal-Konċentrazzjonijiet Effettivi (EC), l-EC150 għas-CD86 u l-EC200 għas-CD54, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha s-sustanzi kimiċi tat-test jinduċu RFI ta' 150 jew ta' 200. Dawn il-valuri tal-EC potenzjalment jistgħu jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza tas-sensitizzazzjoni (9) meta jintużaw

f'approċċi integrati bhall-IATA (4) (5) (6) (7) (8). Dawn jistgħu jiġu kkalkolati bl-ekwazzjonijiet li ġejjin:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{conc} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{conc} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

fejn

A_{conc} hi l-anqas konċentrazzjoni f'µg/ml bl-RFI > 150 (CD86) jew 200 (CD54)

B_{conc} hi l-ogħla konċentrazzjoni f'µg/ml bl-RFI < 150 (CD86) jew 200 (CD54)

A_{RFI} hi l-RFI fl-anqas konċentrazzjoni bl-RFI > 150 (CD86) jew 200 (CD54)

B_{RFI} hi l-RFI fl-ogħla konċentrazzjoni bl-RFI < 150 (CD86) jew 200 (CD54)

Għall-fini ta' derivazzjoni aktar preċiża tal-valuri tal-EC150 u tal-EC200, jistgħu jkunu meħtieġa tliet sessjonijiet indipendenti għall-*kejl tal-espressjoni tas-CD86/CD54*. Imbagħad il-valuri finali tal-EC150 u tal-EC200 jiġu determinati bħala l-valur medjan tal-ECs ikkalkolati mit-tliet sessjonijiet indipendenti. Meta tnejn biss mit-tliet sessjonijiet indipendenti jissodisfaw il-kriterji għall-pożittività (ara l-paragrafi 26-27), tiġi adottata l-ogħla waħda mill-EC150 jew mill-EC200 taż-żewġ valuri kkalkolati.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

29. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża l-metodu h-CLAT (22) (27).

- Il-vijabbiltajiet taċ-ċelloli tal-medium u l-kontrolli b'solvent/b'veikolu għandhom ikunu akbar minn 90 %.
- Fil-kontroll b'solvent/b'veikolu, il-valuri tal-RFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 ma għandhomx jaqbu l-kriterji pożittivi (CD86 RFI $\geq$ 150 % u CD54 RFI $\geq$ 200 %). Il-valuri tal-RFI tal-kontroll b'solvent/b'veikolu jiġu kkalkolati bl-użu tal-formula deskritta fil-paragrafu 25 ("MFI tas-sustanza kimika" għandha tiġi sostitwita b'"MFI tas-solvent/tal-veikolu", u "MFI tas-solvent/tal-veikolu" għandha tiġi sostitwita b'"MFI ta' kontroll (b'medium)").
- Għall-kontrolli b'medium kif ukoll daww b'solvent/b'veikolu, il-proporzjon tal-MFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 għall-kontroll b'isotip għandu jkun > 105 %.
- Fil-kontroll pożittiv (DNCB), il-valuri tal-RFI tas-CD86 kif ukoll tas-CD54 għandhom jissodisfaw il-kriterji pożittivi (CD86 RFI $\geq$ 150 u CD54 RFI $\geq$ 200) u l-vijabbiltà taċ-ċelloli għandha tkun akbar minn 50 %.
- Għas-sustanza kimika tat-test, il-vijabbiltà taċ-ċelloli għandha tkun akbar minn 50 % f'tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet ittestjati f'kull sessjoni.

30. Ir-rizultati negattivi jkunu aċċettabbli biss għal sustanzi kimiċi tat-test li jesibixxu vijabbiltà taċ-ċelloli ta' anqas minn 90 % fl-ogħla konċentrazzjoni ttestjata (jiġifieri $1,2 \times CV75$ skont l-iskema ta' dilwizzjonijiet serjali deskritta fil-paragrafu 20). Jekk il-vijabbiltà taċ-ċelloli f' $1,2 \times CV75$ tkun daqs jew akbar minn 90 %, ir-rizultat negattiv għandu jiġi injorat. F'dan il-każ, hu rakkomandat li wiehed jipprova jirfina l-għażla tad-doża billi jirrepeti d-determinazzjoni tas- $CV75$. Ta' min jinnota li meta jintużaw 5000 µg/ml f'salina (jew f'medium jew f'solventi/veikoli oħra), 1000 µg/ml f'DMSO jew l-ogħla konċentrazzjoni solubbli bħala l-konċentrazzjoni massimali tat-test ta' sustanza kimika tat-test, rizultat negattiv ikun aċċettabbli anki jekk il-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun akbar minn 90 %.

Rapport tat-test

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

Sustanza kimika tat-test

Sustanza monokostitwenti

- Identifikazzjoni kimika, 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 fizika, il-Log Kow, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;
- It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Sustanza multikostitwenti, UVCB u taħlita

- Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;
- Id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);

- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kontrolli

Kontroll pożittiv

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fiżika, il-Log K_{ow} is-solubbiltà fl-ilma, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;
- It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv u b'solvent/b'veikolu

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintuża solvent/veikolu ieħor li ma jkunx fost daww imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-kundizzjonijiet tat-test

- L-isem u l-indirizz tal-isponsor, tal-facilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;
- Deskrizzjoni tat-test użat;
- Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-facilità mnejn inkisbet);

- Iċ-ċitometrija tal-fluss użata (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrumenti, il-globulina, l-antikorpi u l-markatur taċ-ċitotossicità użat;
- Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tat-test bl-ittestjar ta' sustanzi ta' profiċjenza, u l-proċedura użata biex tintwera prestazzjoni riproducibbli tat-test maż-żmien, eż. *data* storika tal-kontroll u/jew *data* storika tal-kontrolli tar-reattività.

Kriterji ta' aċċettazzjoni tat-test

- Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, tal-MFI u tal-RFI miksuba bil-kontroll b'solvent/b'veikolu meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;
- Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tal-RFI miksuba bil-kontroll pożittiv meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;
- Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-konċentrazzjonijiet ittestjati kollha tas-sustanza kimika tat-test.

Il-proċedura tat-test

- In-numru ta' sessjonijiet użati;
- Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat);
- Id-durata tal-esponiment (jekk tkun differenti minn dik rakkomandata);
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

- Tabulazzjoni tad-*data*, inklużi s-CV75 (jekk applikabbli), il-valuri ġeometriċi tal-MFI, tal-RFI u tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-valuri tal-EC150/EC200 (jekk applikabbli) miksuba għas-sustanza kimika tat-test u għall-kontroll pożittiv f'kull sessjoni, u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell tat-tbassir;
- Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

- Diskussjoni tar-riżultati miksubin bil-metodu h-CLAT;
- Kunsiderazzjoni tar-riżultati tat-test fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767-773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Aċċessibbli fuq: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.

- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible fuq: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible fuq: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1699.
- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for

- evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessibbli fuq: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi, Franza, 2005, 96 pp.
- (22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Disponibbli fuq: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) In-Nazzjonijiet Uniti (2013) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

Appendiċi 1.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (21).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (22).

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

CV75: Il-konċentrazzjoni stmata li turi vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 75 %.

EC150: il-konċentrazzjonijiet li juru l-valuri tal-RFI ta' 150 fl-espressjoni ta' CD86

EC200: il-konċentrazzjonijiet li juru l-valuri tal-RFI ta' 200 fl-espressjoni ta' CD54

Ċitometrija tal-fluss: teknika ċitometrika li fiha ċ-ċelloli sospizi fi fluwidu jiffluwixxu waħda, waħda permezz ta' fokus ta' dawl tal-eċitament, li jitferrex f'mudelli karatteristiċi għaċ-ċelloli u għall-komponenti tagħhom; iċ-ċelloli spiss jiġu tikkettati b'markaturi fluworexxenti biex id-dawl l-ewwel jiġi assorbit imbagħad jinheles fi frekwenzi differenti.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), għall-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew għall-valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-htieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

Kontroll b'medium: Replika mhux ittrattata li fiha l-komponenti kollha ta' sistema tat-test. Dan il-kampjun jiġi proċessat b'kampjuni ttrattati bis-sustanza kimika tat-test u kampjuni tal-kontroll oħrajn biex jiġi determinat jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

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

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

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

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

Preapteni: sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika

Proapteni: sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jeħilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda

Intensità relattiva tal-fluworexxenza (RFI): Valuri relattivi tal-intensità medja ġeometrika tal-fluworexxenza (MFI) f'ċelloli trattati bis-sustanza kimika meta mqabbla mal-MFI f'ċelloli trattati b'solvent/b'veikolu.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (21).

Affidabbiltà: Kejljiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproducibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (21).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (21).

Bafer tat-tilwin: Salina baferjata b'fosfat li fiha 0,1 % albumina tas-serum tal-bovini.

Kontroll b'solvent/b'veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test hliet tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bażi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbilment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkurrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifiċità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategorċi, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

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

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

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawżjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (23).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Test validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (21).

Appendiċi 1.2

SUSTANZI TA' PROFICJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni tal-h-CLAT għall-10 sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri tas-CV70, tal-EC150 u tal-EC200 li jaqgħu fi hdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza. Is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bil-metodu h-CLAT. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għall-metodu h-CLAT (3) (14).

Tabella 1: Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bil-metodu h-CLAT

Sustanzi ta' Profiċjenza	CASRN	Stat fiżiku	Tbassir <i>in vivo</i> ¹	Medda ta' Riferiment ta' CV75 f'µg/ml ²	Riżultati tal-h-CLAT għal CD86 (Medda ta' Riferiment ta' EC150 f'µg/ml) ²	Riżultati tal-h-CLAT għal CD54 (Medda ta' Riferiment ta' EC200 f'µg/ml) ²
2,4-Dinitroklorobenzen	97-00-7	Solidu	Sensitizzatur (estrem)	2-12	Pożittiv (0,5-10)	Pożittiv (0,5-15)
4-Fenilenediammina	106-50-3	Solidu	Sensitizzatur (b'saħħtu)	5-95	Pożittiv (<40)	Negattiv (>1,5) ³
Sulfat tan-nikil	10101-97-0	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	30-500	Pożittiv (<100)	Pożittiv (10-100)
2-Merkaptbenzotjażol	149-30-4	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	30-400	Negattiv (>10) ³	Pożittiv (10-140)
R(+)-Limonen	5989-27-5	Likwidu	Sensitizzatur (dghajjef)	>20	Negattiv (>5) ³	Pożittiv (<250)
Urea tal-imidażolidinil	39236-46-9	Solidu	Sensitizzatur (dghajjef)	25-100	Pożittiv (20-90)	Pożittiv (20-75)
Isopropanol.	67-63-0	Likwidu	Mhux sensitizzatur	>5000	Negattiv (>5000)	Negattiv (>5000)
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	>5000	Negattiv (>5000)	Negattiv (>5000)
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	1500-5000	Negattiv (>5000)	Negattiv (>5000)
4-aċidu aminobenżojku	150-13-0	Solidu	Mhux sensitizzatur	>1000	Negattiv (>1000)	Negattiv (>1000)

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

¹ It-tbassir tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* hu bbażat fuq *data* tal-LLNA (3) (14). Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (24).

² Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (13) (25).

³ Storikament, maġġoranza tar-risultati negattivi nkisbet għal dan il-markatur u, għalhekk, hu primarjament mistenni risultat negattiv. Il-medda pprovduta għet definita fuq il-bażi tal-ftit risultati pożittivi storiċi osservati. F'każ li jinkiseb risultat pożittiv, il-valur tal-EC għandu jkun fi hdan il-medda ta' riferiment rapportata.

Appendiċi 2

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: IT-TEST TA' ATTIVAZZJONI TAL-LINJA TA' ĊELLOLI U937 (U-SENS™)

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. It-test U-SENS™ jikkwantifika t-tibdil fl-espressjoni ta' markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli assoċjat mal-proċess ta' attivazzjoni tal-monoċiti u taċ-ċelloli dendritiċi (DC) (jiġifieri CD86), fil-linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana U937, wara esponiment għas-sensitizzaturi (1). Il-livelli ta' espressjoni mkejla tal-markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 fil-linja ta' ċelloli U937 imbagħad jintużaw għas-sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.
2. It-test U-SENS™ ġie evalwat fi studju tal-validazzjoni (2) koordinat minn L'Oreal u wara sarlu rieżami bejn il-pari indipendenti mill-Kumitat Xjentifiku Konsultattiv (ESAC) tal-Laboratorju ta' Riferiment tal-Unjoni Ewropea għall-Alternattivi għall-Ittestjar fuq l-Animali (EURL ECVAM) (3). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, il-U-SENS™ kien rakkomandat mill-EURL ECVAM (4) biex jintuża bħala parti minn IATA b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini ta' klassifikazzjoni u ta' tikkettar tal-perikli. Fid-dokument ta' gwida tagħha dwar ir-rapportar ta' approċċi strutturata għall-integrazzjoni tad-*data* u għas-sorsi ta' informazzjoni individwali użati fi hdan IATA għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, bħalissa l-OECD qed tiddiskuti numru ta' studji tal-każ li jiddeskrivu strategiji ta' ttestjar u mudelli ta' tbassir differenti. Wiehed mill-approċċi definiti differenti hu bbażat fuq l-assaġġ U-SENS (5). Eżempji tal-użu ta' *data* ta' U-SENS™ flimkien ma' informazzjoni oħra, inkluża *data* storika u *data* umana valida eżistenti (6), huma rapportati wkoll f'postijiet oħra fid-dokumentazzjoni (4) (5) (7).
3. It-test U-SENS™ wera li kien trasferibbli għal-laboratorji esperjenzati f'tekniki tal-koltura taċ-ċelloli u fl-analiżi taċ-ċitometrija tal-fluss. Il-livell ta' riproduttibilità fil-previżjonijiet li jistgħu jkunu mistennija mit-test hu fl-ordni ta' 90 % u 84 % fi hdan il-laboratorji u bejn il-laboratorji, rispettivament (8). Ir-risultati ġġenerati fl-istudju ta' validazzjoni (8) u fi studji ppubblikati oħra (1) b'mod ġenerali jindikaw li, meta mqabbla mar-risultati tal-LLNA, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 86 % (N=166) b'sensittività ta' 91 % (118/129) u bi speċifiċità ta' 65 % (24/37). Meta mqabbla mar-risultati umani, l-akkuratezza fid-distinzjoni tas-sensitizzaturi tal-ġilda (jiġifieri Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi hi ta' 77 % (N=101) b'sensittività ta' 100 % (58/58) u bi speċifiċità ta' 47 % (20/43). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz imqabbla mal-LLNA bil-U-

SENS™ għandhom probabbiltà akbar li jikkonċernaw sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa sa moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn sustanzi kimiċi li juru potenza għolja tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri s-subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (1) (8) (9). Meħuda kollha f'daqqa, din l-informazzjoni tindika l-utilità tat-test U-SENS™ biex jikkontribwixxi għall-identifikazzjoni tal-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. Madankollu, il-valuri tal-akkuratezza mogħtija hawnhekk għall-U-SENS™ bħala test waħdu huma indikattivi biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati metodi mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li t-test LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li t-test U-SENS™ kien applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test (inklużi ingredjenti kozmetiċi, eż. preservattivi, tensjoattivi, attivi, koloranti) li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' proprjetajiet fiżikokimiċi, ta' potenza ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif determinata fi studji *in vivo*) u tal-ispettru ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni magħruf li jkunu assoċjati ma' sensitizzazzjoni tal-ġilda (jiġifieri aċċettatur ta' Michael, formazzjoni bażi ta' Schiff, aġent ta' trasferiment tal-aċil, sostituzzjoni nukleofilika bimolekulari [SN₂], jew sostituzzjoni aromatika nukleofilika [SN_{Ar}]) (1) (8) (9) (10). It-test U-SENS™ hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li huma solubbli jew li jiffurmaw dispersjoni stabbli (jiġifieri kollojdi jew sospensjoni li fiha s-sustanza kimika tat-test ma tistabbilixxix ruhha u lanqas ma tisepara mis-solvent/mill-veikolu f'fażijiet differenti) f'solvent/veikolu xieraq (ara l-paragrafu 13). Sustanzi kimiċi fis-sett tad-*data* rapportat bħala preapteni (jiġifieri sustanzi attivati b'ossidazzjoni) jew proapteni (jiġifieri sustanzi li jeħtieġu attivazzjoni enzimatika, pereżempju permezz tal-enzimi P450) tbassru kif suppost mill-U-SENS™ (1) (10). Sustanzi li jinterferixxu mal-membrana jistgħu jwasslu għal riżultati pożittivi foloz minhabba żieda mhux speċifika ta' espressjoni ta' CD86, hekk kif tlieta minn seba' pożittivi foloz relatati mal-klassifikazzjoni ta' riferiment *in vivo* kienu tensjoattivi (1). B'hekk, riżultati pożittivi b'tensjoattivi għandhom jiġu kkunsidrati bil-galbu filwaqt li riżultati negattivi b'tensjoattivi xorta waħda jistgħu jintużaw b'sostenn tal-identifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test bħala mhux sensitizzatur. Is-sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti jistgħu jiġu vvalutati bil-U-SENS™ (1), iżda sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom li jehilsu l-istess tul ta' mewġa bħal istjoċjanat tal-fluworexxeina (FITC) jew bħala jodur tal-propidju (PI), jinterferixxu mad-detezzjoni ċitometrika tal-fluss u b'hekk ma jistgħux jiġu evalwati kif suppost bl-użu ta' antikorpi konjugati tal-FITC (negattiv falz potenzjali) jew bl-użu tal-PI (il-vijabbiltà ma tistax titkejjel). F'każ bħal dan, antikorpi oħra taggjati bi fluworokromu jew markaturi oħra taċ-ċitotossiċità, rispettivament, jistgħu jintużaw dment li jkun jista' jintwera li jipprovdur riżultati simili bħall-antikorpi taggjati bl-FITC jew il-PI (ara l-paragrafu 18), eż. bl-ittestjar

tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Fid-dawl ta' dan ta' hawn fuq, ir-riżultati pożittivi b'tensjoattivi u r-riżultati negattivi b'sustanzi kimiċi tat-test fluworexxenti b'saħħithom għandhom jiġu interpretati fil-kuntest tal-limitazzjonijiet iddikjarati u flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fi hdan il-kuntest tal-IATA. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tat-test U-SENS™ għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, dan ma għandux jintuża għal daww il-kategoriji speċifiċi.

5. Kif deskritt aktar 'il fuq, it-test U-SENS™ isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Madankollu, għandu l-potenzjal li jikkontribwixxi għall-valutazzjoni tal-potenza ta' sensitizzazzjoni ukoll meta jintuża f'approċċi integrati bħall-IATA. Minkejja dan, hemm bżonn li jsir aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' data mill-bniedem, biex jiġi stabbilit kif ir-riżultati tal-U-SENS™ jistgħu jinformati valutazzjoni tal-potenza.
6. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 2.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. It-test U-SENS™ hu assaġġ *in vitro* li jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 fuq linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana, iċ-ċelloli U937, wara esponiment għal 45 ± 3 siġhat għas-sustanza kimika tat-test. Il-markatur tas-superfiċje CD86 hu markatur tipiku minnhom tal-attivazzjoni tal-U937. Is-CD86 hu magħruf bħala molekula kostimolatorja li tista' timita l-attivazzjoni monoċitika, li taqdi rwol kritiku fil-primazzjoni taċ-ċelloli-T. It-tibdiliet fl-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 jitkejlu b'ċitometrija tal-fluss wara tilwin taċ-ċelloli, tipikament b'antikorpi tikkettati (bl-FITC) tal-istjoċjanat tal-fluworexxeina. Il-kejl taċ-ċitotossità jsir fl-istess hin ukoll (eż. bl-użu tal-PI) biex jiġi vvalutat jekk s-sovraregolazzjoni tal-espressjoni tal-markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli CD86 isseħħ f'koncentrazzjonijiet subċitotossici. L-indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tal-markatur tas-superfiċje taċ-ċelloli mqabbel mal-kontroll b'solvent/b'veikolu hu kkalkolat u jintuża fil-mudell tat-tbassir (ara l-paragrafu 19), b'sostenn tad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi.

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

8. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 bħala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 11 f'konformità mal-Prattiki Tajba tal-Metodi *in vitro* (11). Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* generata bil-

kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 11) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 15-16), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROCEDURA

9. Dan it-test hu bbażat fuq il-protokoll nru 183 (12) tal-U-SENS™ DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM). Għandhom jithaddmu l-Proċeduri Operatorji Standard (SOP) meta jiġi implimentat u meta jintuża t-test U-SENS™ fil-laboratorju. Tista' tintuża sistema awtomatizzata biex isir il-U-SENS™ jekk ikun jista' jintwera li din tipprovdi riżultati simili, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Din li ġejja hi deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin għat-test U-SENS™.

Thejjija taċ-ċelloli

10. Il-linja ta' ċelloli tal-linfoma istjoċitika umana, U937 (13), għandha tintuża għat-twettiq tat-test U-SENS™. Iċ-ċelloli (klonu CRL1593.2) għandhom jinkisbu minn bank taċ-ċelloli kwalifikat sew, bħall-American Type Culture Collection.
11. Iċ-ċelloli U937 huma kulturati f'37°C f'5 % CO₂ u atmosfera umidifikata f'medium RPMI-1640 supplimentat b'10 % serum tal-ghoġġiela fetali (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 unità/ml penicillina u 100 µg/ml streptomycin (medium komplut). Iċ-ċelloli U937 jiġu passaġġati bħala rutina kull jumejn/tlieta bid-densità ta' 1,5 jew 3×10^5 ċelloli/ml, rispettivament. Id-densità taċ-ċelloli ma għandhiex taqbeż it- 2×10^6 ċelloli/ml u l-vijabbiltà taċ-ċelloli mkejla bl-esklużjoni tal-blu tirpan għandha tkun ≥ 90 % (ma għandhiex tiġi applikata fl-ewwel passaġġ wara t-taħlil). Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, kull lott ta' ċelloli, ta' FCS jew ta' antikorp għandu jiġi kwalifikat billi jsir kontroll tar-reattività. Il-kontroll tar-reattività taċ-ċelloli għandu jsir bl-użu tal-kontroll pożittiv, l-aċidu pikrilsulfoniku (2,4,6-Trinitro-benzen-aċidu sulfoniku: TNBS) (CASRN 2508-19-2, ≥ 99 % purità), u l-kontroll negattiv, aċidu lattiku (LA) (CASRN 50-21-5, ≥ 85 % purità), tal-anqas ġimgha wara t-taħlil. Għall-kontroll tar-reattività, għandhom jiġu ttestjati sitt konċentrazzjonijiet finali għal kull wiehed miż-2 kontrolli (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100µg/ml u LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200µg/ml). TNBS solubilizzat f'medium komplut għandu jipproduċi rispons pożittiv u relatat mal-konċentrazzjoni tas-CD86 (eż. meta konċentrazzjoni pożittiva, S.I. tas-CD86 ≥ 150 , tkun segwita minn konċentrazzjoni b'S.I. tas-CD86 li jibqa' jizdied), u LA solubilizzat f'medium komplut għandu jipproduċi rispons negattiv tas-CD86 (ara l-paragrafu 21). Hu biss il-lott ta' ċelloli li jgħaddi mill-kontroll tar-reattività darbtejn li għandu jintuża għall-assaġġ. Iċ-ċelloli jistgħu jiġu propagati sa seba' ġimghat wara li jinħallu. In-numru tal-passaġġ ma għandux jaqbeż il-21. Il-kontroll tar-reattività għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 18-22.

12. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli U937 jinżerghu f'densità ta' 3×10^5 ċelloli/ml jew 6×10^5 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati fi flasks tal-koltura għal jumejn jew għal jum (1), rispettivament. Jistgħu jintużaw kundizzjonijiet prekolturati oħra differenti minn dawk deskritti hawn fuq jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti u jekk ikun jista' jintwera li dawn jipprovdu riżultati simili, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Fil-jum tal-ittestjar, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jerġgħu jiġu sospizi b'medium tat-tkabbir frisk f' 5×10^5 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jitqassmu fi pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra b'100 μ l (densità finali ta' ċelloli ta' $0,5 \times 10^5$ ċelloli/bwejra).

Thejjiġa tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

13. Il-valutazzjoni tas-solubbiltà ssir qabel l-ittestjar. Għal dan l-għan, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti jew dispersi b'mod stabbli f'konċentrazzjoni ta' 50 mg/ml f'medium komplut bħala s-solvent tal-ewwel għażla jew id-dimetil sulfossidu (DMSO, ≥ 99 % purità) bħala s-solvent/il-veikolu tat-tieni għażla jekk is-sustanza kimika tat-test ma tkunx solubbli fis-solvent/fil-veikolu tal-medium komplut. Għall-ittestjar, is-sustanza kimika tat-test tiġi dissolta sa konċentrazzjoni finali ta' 0,4 mg/ml f'medium komplut jekk is-sustanza kimika tkun solubbli f'dan is-solvent/il-veikolu. Jekk is-sustanza kimika tkun solubbli f'DMSO biss, is-sustanza kimika tiġi dissolta f'konċentrazzjoni ta' 50 mg/ml. Solventi/veikoli oħra li mhumex dawk deskritti hawn fuq jistgħu jintużaw jekk tiġi pprovduta raġuni xjentifika suffiċjenti. L-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test fis-solvent/fil-veikolu finali għandha tiġi kkunsidrata.
14. Is-sustanzi kimiċi tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jithejjew dakinhar tal-ittestjar. Minhabba li ma jsirx assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża, għall-ewwel sessjoni għandhom jiġu ttestjati sitt konċentrazzjonijiet finali (1, 10, 20, 50, 100 u 200 μ g/ml) fis-solvent/fil-veikolu korrispondenti f'medium komplut jew inkella f'medium ta' 0,4 % DMSO. Għas-sessjonijiet sussegwenti, b'bidu miż-0,4 mg/ml f'medium komplut jew b'50 mg/ml f'DMSO, is-soluzzjonijiet tas-sustanzi kimiċi tat-test, tal-anqas jithejjew 4 soluzzjonijiet għall-użu (jiġifieri tal-anqas 4 konċentrazzjonijiet) bl-użu tas-solvent/tal-veikolu korrispondenti. Is-soluzzjonijiet għall-użu finalment jintużaw għat-trattament billi jiżdied volum ugwali ta' sospensjoni ta' ċelloli U937 (ara l-paragrafu 11 aktar 'il fuq) mal-volum tas-soluzzjoni għall-użu fil-pjastra biex tinkiseb dilwizzjoni ulterjuri ta' darbtejn (12). Il-konċentrazzjonijiet (tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet) għal kwalunkwe sessjoni ulterjuri jintgħażlu fuq il-bażi tar-riżultati individwali tas-sessjonijiet preċedenti kollha (8). Il-konċentrazzjonijiet finali utilizzabbli huma ta' 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 u 200 μ g/ml. Il-konċentrazzjoni finali massima hi ta' 200 μ g/ml. Fil-każ li jiġi osservat valur pożittiv tas-CD86 f'1 μ g/ml, 0,1 μ g/ml tiġi evalwata biex tinstab il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test li ma

tinduċix is-CD86 f'livell oghla mil-limitu pożittiv. Għal kull sessjoni, l-EC150 (konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tilhaq il-limitu pożittiv ta' CD86 ta' 150 %, ara l-paragrafu 19) tiġi kkalkolata jekk jiġi osservat rispons pożittiv għall-konċentrazzjoni tas-CD86. Meta s-sustanza kimika tat-test tinduċi rispons pożittiv għas-CD86 li ma jkunx relatat mal-konċentrazzjoni, il-kalkolu tal-EC150 jaf ma jkunx rilevanti kif deskritt fil-protokoll nru 183 (12) tad-DB-ALM tal-U-SENS™. Għal kull sessjoni, is-CV70 (konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tilhaq il-limitu ta' ċitotossicità ta' 70 %, ara l-paragrafu 19) tiġi kkalkolata kull fejn possibbli (12). Biex jiġi investigat l-effett tar-rispons għal konċentrazzjoni ta' zieda fis-CD86, kwalunkwe konċentrazzjoni mill-konċentrazzjonijiet utilizzabbli għandha tingħazel eżatt f'nofs l-EC150 (jew l-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitotossika negattiva tas-CD86) u s-CV70 (jew l-ogħla konċentrazzjoni awtorizzata, jiġifieri 200 µg/ml). Tal-anqas għandhom jiġu ttestjati 4 konċentrazzjonijiet għal kull sessjoni b'tal-anqas żewġ konċentrazzjonijiet li jkunu komuni għas-sessjoni(jiet) preċedenti, għall-finijiet ta' tqabbil.

15. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu użat fit-test U-SENS™ hu medium komplut (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli) (ara l-paragrafu 4) jew 0,4 % DMSO f'medium komplut (għal sustanzi kimiċi tat-test solubilizzati jew dispersi b'mod stabbli fid-DMSO).
16. Il-kontroll pożittiv użat fit-test U-SENS™ hu TNBS (ara l-paragrafu 11), imhejji f'medium komplut. TNBS għandu jintuża bħala l-kontroll pożittiv għall-kejl tal-espressjoni ta' CD86 f'konċentrazzjoni waħda finali fil-pjastra (50 µg/ml) li trendi > 70 % tal-vijabbiltà taċ-ċelloli. Biex tinkiseb konċentrazzjoni ta' 50 µg/ml ta' TNBS fil-pjastra, soluzzjoni ewlenija ta' 1 M (jiġifieri 293 mg/ml) ta' TNBS f'medium komplut tithejja u tkompli tiġi dilwita għal 2930 darba b'medium komplut għal soluzzjoni għall-użu ta' 100 µg/ml. L-aċidu lattiku (LA, CAS 50-21-5) għandu jintuża bħala l-kontroll negattiv f'200 µg/ml solubilizzat f'medium komplut (minn soluzzjoni ewlenija ta' 0,4 mg/ml). F'kull pjastra ta' kull sessjoni, jithejjew tliet repliki ta' kontroll mhux trattat ta' medium komplut, ta' kontroll b'solvent/b'veikolu, u ta' kontrolli negattivi u pożittivi (12). Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli. Il-kriterji ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni huma l-istess bħal dawk deskritti għas-sustanza kimika tat-test (ara l-paragrafu 12).

Applikazzjoni tas-sustanzi kimiċi tat-test u tas-sustanzi tal-kontroll

17. Il-kontroll b'solvent/b'veikolu jew is-soluzzjonijiet għall-użu deskritti fil-paragrafi 14-16 jithalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mhejjija fil-pjastra b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (ara l-paragrafu 12). Imbagħad il-pjastri trattati jiġu inkubati għal 45±3 siegħa f'37°C f'5 % CO₂. Qabel l-inkubazzjoni, il-pjastri jiġu ssigillati b'membrana

semipermeabbli, biex jiġu evitati evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn ċelloli trattati bis-sustanzi kimiċi tat-test (12).

Tilwin taċ-ċelloli

18. Wara esponiment għal 45 ± 3 siegħa, iċ-ċelloli jiġu trasferiti fi pjastra għall-mikrotitraġġ forma ta' V u jingabru b'ċentfigurazzjoni. L-interferenza tas-solubbiltà hi definita bħala kristalli jew taqtiriet osservati taħt il-mikroskopju 45 ± 3 sigħat wara t-trattament (qabel it-tilwin taċ-ċelloli). Is-supernatanti jintremew u iċ-ċelloli li jifdal jinħaslu darba b'100 μ l salina baferjata tal-fosfat (PBS) kiesha silġ li jkun fiha 5 % serum tal-ghoġġiela fetali (bafer tat-tilwin). Wara ċ-ċentrifugrazzjoni, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi b'100 μ l bafer tat-tilwin u jitlewnu b'5 μ l (eż. 0,25 μ g) antikorpi anti-CD86 tikkettati bl-FITC jew tal-IgG1 (isotip) tal-ġrieden f'4°C għal 30 min protetti mid-dawl. Għandhom jintużaw l-antikorpi deskritti fil-protokoll nru 183 tad-DB-ALM ta' U-SENS™ (12) (għal CD86: BD-PharMingen #555657 Klonu: Fun-1, jew Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Klonu: BU63; u għal IgG1: BD-PharMingen #555748, jew Caltag/Invitrogen # GM4992). Fuq il-bażi tal-esperjenza tal-iżviluppaturi tat-test, l-intensità tal-fluworessenza tal-antikorpi normalment tkun konsistenti bejn lottijiet differenti. Kloni oħra jew fornitur ieħor tal-antikorpi li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività jistgħu jintużaw għall-assaġġ (ara l-paragrafu 11). Madankollu, l-utenti jistgħu jikkunsidraw it-titrazzjoni tal-antikorpi fil-kundizzjonijiet tal-laboratorju tagħhom stess biex jiddefinixxu l-aħjar konċentrazzjoni għall-użu. Tista' tintuża sistema oħra ta' identifikazzjoni, eż. antikorpi anti-CD86 taggjati bil-fluworokromu, jekk jista' jintwera li din tipprovdri riżultati simili bħall-antikorpi konjugati bl-FITC, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2. Wara l-hasil b'100 μ l bafer tat-tilwin darbtejn u darba b'100 μ l PBS kiesha silġ, iċ-ċelloli jerġgħu jiġu sospiżi f'PBS kiesha silġ (eż. 125 μ l għal kampjuni li jiġu analizzati manwalment tubu, tubu, jew 50 μ l bl-użu ta' pjastra tal-awtokampjunar) u tiżdied soluzzjoni tal-PI (konċentrazzjoni finali ta' 3 μ g/ml). Jistgħu jintużaw markaturi oħra taċ-ċitotossicità, bħal 7-Amminoactinomicina D (7-AAD) jew Tripan blu jekk it-tilwin alternattiv ikun jista' jintwera li jipprovdri riżultati simili bħall-PI, pereżempju bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza fl-Appendiċi 2.2.

Analizi taċ-ċitometrija tal-fluss

19. Il-livell ta' espressjoni tas-CD86 u l-vijabbiltà taċ-ċelloli jiġu analizzati bl-użu taċ-ċitometrija tal-fluss. Iċ-ċelloli jintwerew fi ħdan dot plot tad-daqs (FSC) u tal-granularità (SSC) stabbilita għall-iskala log biex tiġi identifikata biċ-ċar il-popolazzjoni fl-ewwel gate R1 u jiġu eliminati l-fdalijiet. Jinkiseb total fil-mira ta' 10 000 ċellola fil-gate R1 għal kull bwejra. Iċ-ċelloli mill-istess gate R1 jintwerew fi ħdan dot pot FL3 jew FL4 / SSC. Iċ-ċelloli vijabbli jiġu delineati billi titqiegħed it-tieni gate R2 li tagħżel il-popolazzjoni taċ-ċelloli negattivi għall-jodur tal-propidju (kanal FL3 jew FL4). Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tista'

tigi kkalkolata bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja mill-programm ta' analiżi taċ-ċitometru. Meta l-vijabbiltà taċ-ċelloli tkun baxxa, ikunu jistgħu jinkisbu sa 20 000 ċellola inklużi ċ-ċelloli mejtin. Inkella, id-*data* tista' tinkiseb għal minuta waħda wara t-tnedija tal-analiżi.

$$\text{Vijabbiltà taċ - ċelloli} = \frac{\text{Numru ta' ċelloli ħajjin}}{\text{Number totali ta' ċelloli miksubin}} \times 100$$

Imbagħad il-perċentwal ta' ċelloli pożittivi għall-FL1 jitkejjel fost dawn iċ-ċelloli vijabbli li jkunu ġew gated fl-R2 (fi hdan l-R1). L-espressjoni tas-superfiċje taċ-ċelloli tas-CD86 tigi analizzata f' dot plot FL1 / SSC li tkun gated fuq ċelloli vijabbli (R2).

Għall-medium komplut / għall-bwejriet tal-IgG1, il-markatur tal-analiżi jiġi stabbilit qrib il-popolazzjoni ewlenija biex il-kontrolli tal-medium komplut ikollhom IgG1 fi hdan iż-żona fil-mira ta' 0,6 sa 0,9 %.

L-interferenza tal-kulur hi definita bħala ċaqliq tad-dot plot tal-IgG1 tikkettat bl-FITC (S.I. Ġeo Medju tal-FL1 tal-IgG1 ≥ 150 %).

L-indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tas-CD86 għaċ-ċelloli tal-kontrolli (mhux trattati jew f'0,4 % DMSO) u għaċ-ċelloli trattati b'sustanza kimika jiġi kkalkolat skont l-ekwazzjoni li ġejja:

$$S.I. = \frac{\% \text{ taċ-ċelloli trattati bis-CD86}^+ - \% \text{ taċ-ċelloli trattati bl-IgG1}^+}{\% \text{ taċ-ċelloli tal-kontroll bis-CD86}^+ - \% \text{ taċ-ċelloli tal-kontroll bl-IgG1}^+} \times 100$$

% taċ-ċelloli tal-kontroll mhux trattati bl-IgG1⁺: imsejjaħ bħala l-perċentwal taċ-ċelloli IgG1 pożittivi għall-FL1 definiti bil-markatur tal-analiżi (medda aċċettata ta' $\geq 0,6$ % u < 1,5 %, ara l-paragrafu 22) fost iċ-ċelloli mhux trattati vijabbli.

% taċ-ċelloli tal-kontroll/trattati bl-IgG1⁺/CD86⁺: imsejjaħ il-perċentwal ta' ċelloli IgG1/CD86 pożittivi għall-FL1 imkejjel mingħajr ma jiċċaqlaq il-markatur tal-analiżi fost iċ-ċelloli tal-kontroll/trattati vijabbli.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-*data*

20. Il-parametri li ġejjin huma kkalkolati fit-test U-SENSTM: Il-valur tas-CV70, jiġifieri konċentrazzjoni li turi 70 % tas-sopravivenza taċ-ċelloli U937 (30 % ċitotossicità) u l-valur tal-EC150, jiġifieri l-konċentrazzjoni li fiha s-sustanzi kimiċi tat-test jinduċu indiċi ta' stimolazzjoni (S.I.) tas-CD86 ta' 150 %.

Is-CV70 hi kkalkolata b'interpolażzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

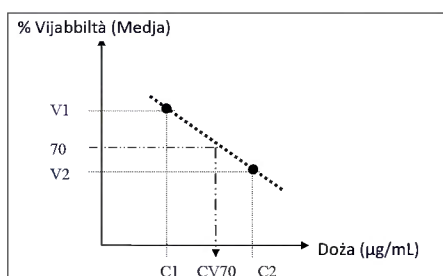
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Fejn:

V1 hu l-valur minimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli oġhla minn 70 %

V2 hu l-valur massimu tal-vijabbiltà taċ-ċelloli anqas minn 70 %

C1 u C2 huma l-konċentrazzjonijiet li juru l-valur tal-vijabbiltà taċ-ċelloli V1 u V2 rispettivament.



Jistgħu jintużaw approċċi oħra biex tinkiseb is-CV70 dment li jintwera li dawn ma jkollhom ebda impatt fuq ir-riżultati (eż. bl-ittestjar tas-sustanzi ta' profiċjenza).

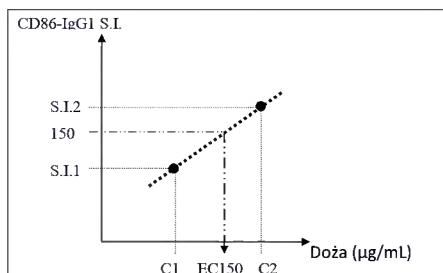
Is-EC150 hi kkalkolata b'interpolazzjoni lineari tal-log bl-użu tal-ekwazzjoni li ġejja:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Fejn:

C1 hi l-oġhla konċentrazzjoni f'µg/ml b'CD86 S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 hi l-anqas konċentrazzjoni f'µg/ml b'CD86 S.I. ≥ 150 % (S.I. 2)



Il-valuri tal-EC150 u tas-CV70 jiġu kkalkolati

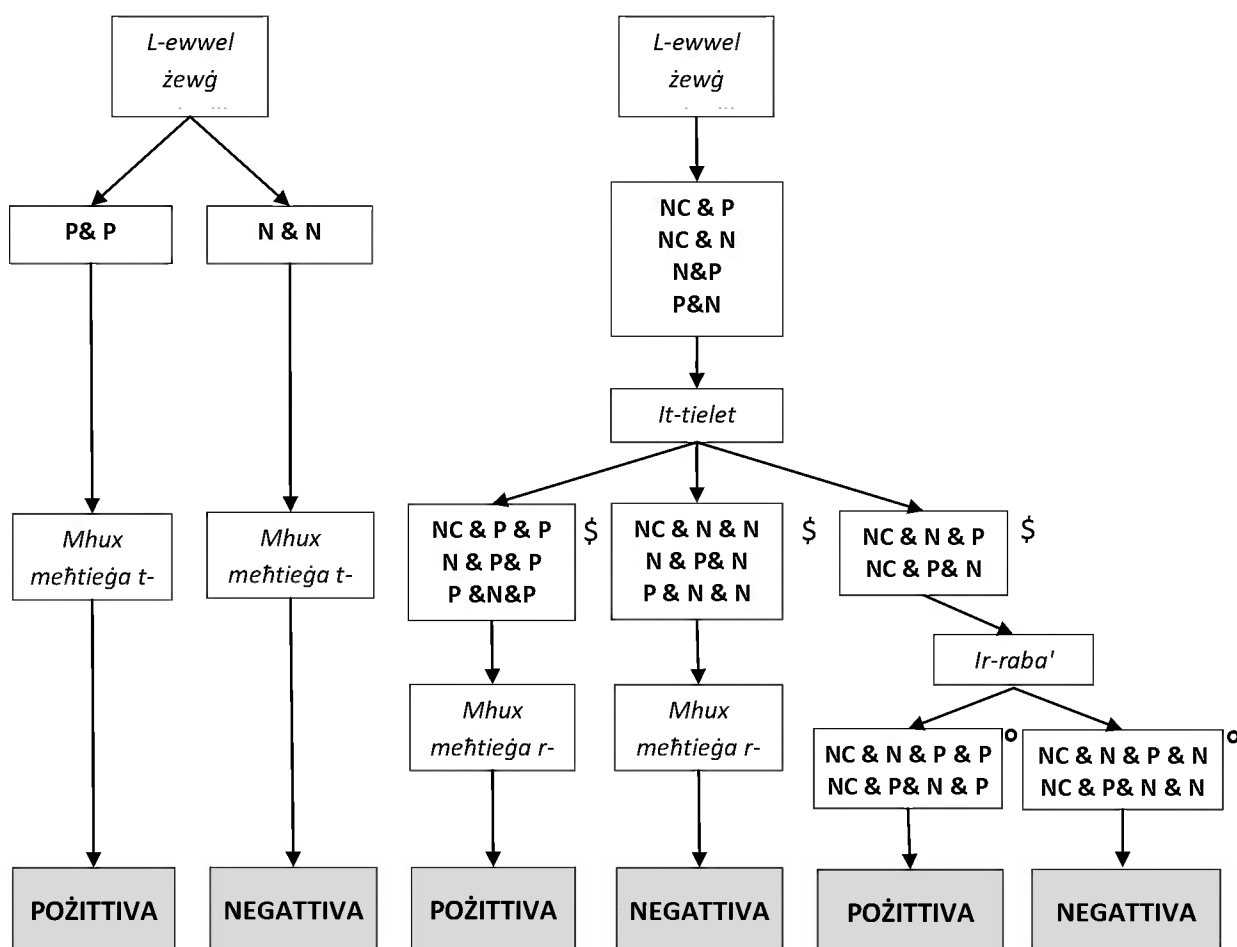
- għal kull sessjoni: il-valuri individwali tal-EC150 u tas-CV70 jintużaw bħala għodod biex jiġi investigat l-effett ta' rispons għall-konċentrazzjoni taż-żieda ta' CD86 (ara l-paragrafu 14).
- fuq il-bażi tal-vijabbiltajiet medji, tiġi determinata s-CV70 ġenerali (12),
- fuq il-bażi tal-S.I. medju tal-valuri tas-CD86, l-EC150 ġenerali tiġi determinata għas-sustanza kimika tat-test prevista bħala POŻITTIVA bil-U-SENSTM (ara l-paragrafu 21) (12).

Mudell ta' tbassir

21. Għall-kejl tal-espressjoni tas-CD86, kull sustanza kimika tat-test tiġi ttestjata f'tal-anqas erba' konċentrazzjonijiet u f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti biex jinkiseb tbassir wiehied (NEGATTIV jew POŻITTIV).

- Il-konklużjoni individwali ta' sessjoni ta' U-SENS™ titqies NEGATTIVA (minn hawn 'il quddiem imsejha N) jekk l-S.I. tas-CD86 ikun anqas minn 150 % fil-konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi kollha (vijabbiltà taċ-ċelloli ≥ 70 %) u jekk ma tiġi osservata ebda interferenza (ċitotossiċità, solubbiltà: ara l-paragrafu 18 jew kulur: ara l-paragrafu 19 indipendentement mill-konċentrazzjonijiet mhux ċitotossiċi li fihom tiġi individwata l-interferenza. Fil-każijiet l-oħra kollha: S.I. ta' CD86 ta' 150 % jew oġġla u/jew interferenzi osservati, il-konklużjoni individwali ta' sessjoni ta' U-SENS™ titqies Pożittiva (minn hawn 'il quddiem imsejha P).
- Tbassir ta' U-SENS™ jitqies NEGATTIV jekk tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti jiġu negattivi (N) (Figura 1). Jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu negattivi (N), it-tbassir ta' U-SENS™ jitqies NEGATTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni.
- Tbassir ta' U-SENS™ jitqies POŻITTIV jekk tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti jiġu pożittivi (P) (Figura 1). Jekk l-ewwel żewġ sessjonijiet it-tnejn ikunu pożittivi (P), it-tbassir ta' U-SENS™ jitqies POŻITTIV u ma jkunx hemm bżonn li ssir it-tielet sessjoni.
- Peress li ma jsirx assaġġ ta' individwazzjoni tad-doża, hemm eċċezzjoni jekk, fl-ewwel sessjoni, l-S.I. ta' CD86 ikun 150 % jew akbar fl-oġġla konċentrazzjoni mhux ċitotossika biss. Imbagħad is-sessjoni titqies MHUX KONKLUŻIVA (NC), u konċentrazzjonijiet addizzjonali (bejn l-oġġla konċentrazzjoni mingħajr ċitotossiċità u l-anqas konċentrazzjoni ta' ċitotossiċità - ara l-paragrafu 20) għandhom jiġu ttestjati f'sessjonijiet addizzjonali. F'każ li sessjoni tiġi identifikata bħala NC, tal-anqas għandhom isiru żewġ sessjonijiet addizzjonali, u r-raba' sessjoni f'każ li t-tieni u t-tielet sessjonijiet ma jkunux jaqblu (N u/jew P indipendentement) (Figura 1). Sessjonijiet ta' segwitu jitqiesu pożittivi anki jekk konċentrazzjoni ċitotossika waħda biss tagħti CD86 ta' 150 % jew aktar, peress li l-issettjar tal-konċentrazzjoni ġie aġġustat għas-sustanza kimika tat-test speċifika. It-tbassir finali jkun ibbażat fuq ir-riżultat tal-maġġoranza tat-tliet jew tal-erba' sessjonijiet individwali (jiġifieri tnejn minn tlieta jew tnejn minn erbgħa) (Figura 1).

Figura 1: Mudell ta' tbassir użat fit-test U-SENS™ Tbassir U-SENS™ għandu jitqies fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjoni tal-paragrafu 4 u tal-paragrafi 7, 8 u 9 tal-Introduzzjoni ġenerali.



N: Sessjoni b'ebda CD86 pożittiv jew interferenza osservati;

P: Sessjoni b'CD86 pożittiv jew interferenza/i osservati;

NC: Mhux Konklużiva. L-ewwel sessjoni b'Ebda Konklużjoni meta s-CD86 ikun pożittiv fl-ogħla konċentrazzjoni mhux ċitossika biss;

#: Konklużjoni individwali Mhux Konklużiva (NC) attribwita biss għall-ewwel sessjoni twassal b'mod awtomatiku għall-htieġa li ssir it-tielet sessjoni biex tintlahaq maġġoranza ta' konklużjonijiet Pożittivi (P) jew Negattivi (N) f'tal-anqas żewġ sessjonijiet indipendenti minn tlieta.

\$: #Il-kaxex juru t-tahlitiet rilevanti ta' riżultati mit-tliet sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel żewġ sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq.

°: #Il-kaxex juru t-tahlitiet rilevanti ta' riżultati mill-erba' sessjonijiet fuq il-bażi tar-riżultati miksuba fl-ewwel tliet sessjonijiet murija fil-kaxxa ta' hawn fuq.

Kriterji ta' aċċettazzjoni

22. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża t-test U-SENS™ (12).

- Fi tmiem il-perjodu ta' esponiment ta' 45 ± 3 sigħat, il-vijabbiltà medja taċ-ċelloli U937 mhux trattati fi triplikati kellha tkun $> 90 \%$ u ma tiġi osservata ebda deriva fl-espressjoni tas-CD86. L-espressjoni bażali tas-CD86 ta' ċelloli U937 mhux trattati kellha taqa' fi hdan il-medda ta' $\geq 2 \%$ u $\leq 25 \%$.
- Meta jintuża DMSO bħala solvent, il-validità tal-kontroll b'veikolu DMSO tiġi vvalutata bil-kalkolu tal-S.I. ta' DMSO meta mqabbel ma' ċelloli mhux trattati, u l-vijabbiltà medja taċ-ċelloli triplikati kellha tkun $> 90 \%$. Il-kontroll b'veikolu DMSO jkun validu jekk il-valur medju tal-S.I. tas-CD86 fi triplikati tiegħu jkun iżgħar minn 250% tal-medja tal-S.I. as-CD86 fi triplikati taċ-ċelloli U937 mhux trattati.
- Is-sessjonijiet jitqiesu validi jekk tal-anqas tnejn minn tliet valuri tal-IgG1 taċ-ċelloli U937 mhux trattati jaqgħu fi hdan il-medda ta' $\geq 0,6 \%$ u $< 1,5 \%$.
- Il-kontroll negattiv (aċidu lattiku) ittestjat b'mod konkorrenti jitqies validu jekk tal-anqas tnejn mit-tliet repliki jkunu negattivi (S.I. tas-CD86 $< 150 \%$) u mhux ċitotossiċi (vijabbiltà taċ-ċelloli $\geq 70 \%$).
- Il-kontroll pożittiv (TNBS) jitqies validu jekk tal-anqas tnejn mit-tliet repliki jkunu pożittivi (S.I. tas-CD86 $\geq 150 \%$) u mhux ċitotossiċi (vijabbiltà taċ-ċelloli $\geq 70 \%$).

Rapport tat-test

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

Sustanza Kimika tat-Test

Sustanza monokostitwenti

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà f'medium komplut, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Sustanza multikostitwenti, UVCB u tahlita:

- Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà f'medium komplut, is-solubbiltà fid-DMSO, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-piż molekulari jew il-piż molekulari apparenti fil-każ ta' taħlitiet/polimeri b'kompożizzjonijiet magħrufin jew informazzjoni oħra rilevanti għat-twettiq tal-istudju;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-ghażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kontrolli

Kontroll pożittiv

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fid-DMSO, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni tas-sessjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv u b'solvent/b'veikolu

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;

- Id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintuża solvent/veikolu ieħor li ma jkunx fost dawk imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test;

Kundizzjonijiet tat-test

- L-isem u l-indirizz tal-isponsor, tal-facilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;
- Deskrizzjoni tat-test użat;
- Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-facilità mnejn inkisbet);
- Iċ-ċitometrija tal-fluss użata (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrumenti, l-antikorpi u l-markatur taċ-ċitotossicità użat;
- Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju fit-twettiq tat-test bl-ittestjar ta' sustanzi ta' profiċjenza, u l-proċedura użata biex tintwera prestazzjoni riproducibbli tat-test maż-żmien, eż. *data* storika tal-kontroll u/jew *data* storika tal-kontrolli tar-reattività.

Kriterji ta' Aċċettazzjoni tat-Test

- Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tal-S.I. tas-CD86 miksuba bil-kontroll b'solvent/b'veikolu meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;
- Il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli u tas-S.I. miksuba bil-kontroll pożittiv meta mqabbla mal-meded ta' aċċettazzjoni;
- Il-vijabbiltà taċ-ċelloli tal-konċentrazzjonijiet ittestjati kollha tas-sustanza kimika tat-test.

Il-proċedura tat-test

- In-numru ta' sessjonijiet użati;
- Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika, l-applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment użat (jekk ikun differenti minn dak rakkomandat);
- Id-durata tal-esponiment;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u deċiżjoni użati;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

- Tabulazzjoni tad-*data*, inklużi s-CV70 (jekk applikabbli), l-S.I., il-valuri tal-vijabbiltà taċ-ċelloli, il-valuri tal-EC150 (jekk applikabbli) miksuba għas-sustanza kimika tat-test u

għall-kontroll pożittiv f'kull sessjoni, u indikazzjoni tal-klassifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test skont il-mudell tat-tbassir;

- Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-Riżultati

- Diskussjoni tar-riżultati miksuba bit-test U-SENS™;
- Kunsiderazzjoni tar-riżultati tat-test fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjonijiet

DOKUMENTAZZJONI

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Dan huwa disponibbli mis-sit web li ġej: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Disponibbli fuq: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705>].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Disponibbli fuq: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/euro-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015).

Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehn, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomici, Pariġi. Disponibbli fuq: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENSTM), 33pp. Dan huwa disponibbli mis-sit web li ġej: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomici, Pariġi. Disponibbli fuq: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) In-Nazzjonijiet Uniti (2015) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Disponibbli fuq: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomici, Pariġi. Disponibbli fuq:

<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Disponibbli fuq: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

Appendiċi 2.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (14).

AOP (Perkors tal-Eżitu Avvers): sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (15).

Rispons għall-konċentrazzjoni tas-CD86: Hemm dipendenza tal-konċentrazzjoni (jew rispons għall-konċentrazzjoni) meta konċentrazzjoni pożittiva (S.I. tas-CD86 ≥ 150) tkun segwita minn konċentrazzjoni b'S.I. li jiżdied tas-CD86.

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew taħlita

CV70: Il-konċentrazzjoni stmata li turi vijabbiltà taċ-ċelloli ta' 70 %.

Deriva: Deriva hi definita i) mill-valur ikkoreġut tal-%CD86⁺ tar-replika tal-kontroll mhux trattat 3 ikun anqas minn 50 % tal-medja tal-valur ikkoreġut tal-%CD86⁺ tar-repliki tal-kontroll mhux trattat 1 u 2; u ii) mill-valur ikkoreġut tal-%CD86⁺ tar-replika tal-kontroll negattiv 3 ikun anqas minn 50 % tal-medja tal-valur ikkoreġut tal-%CD86⁺ tar-repliki tal-kontroll negattiv 1 u 2.

EC150: il-konċentrazzjonijiet stmati li juru l-S.I. ta' 150 % tal-espressjoni tas-CD86.

Ċitometrija tal-fluss: teknika ċitometrika li fiha ċ-ċelloli sospiżi fi fluwidu jiffluwixxu waħda, waħda permezz ta' fokus ta' dawl tal-eċitament, li jitferrex f'mudelli karatteristiċi għaċ-ċelloli u għall-komponenti tagħhom; iċ-ċelloli spiss jiġu tikkettati b'markaturi fluworexxenti biex id-dawl l-ewwel jiġi assorbit imbagħad jinheles fi frekwenzi differenti.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' aġent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża effetti avversi meta organiżmu, sistema jew (sub)popolazzjoni jiġu esposti għal dak l-aġent.

IATA (Approċċ Integrat għall-Ittestjar u l-Valutazzjoni): Approċċ strutturat użat għall-identifikazzjoni ta' perikli (potenzjal), għall-karatterizzazzjoni tal-perikli (potenza) u/jew għall-valutazzjoni tas-sikurezza (potenzjal/potenza u esponiment) ta' sustanza kimika jew ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-htieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

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

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

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

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

Preapteni: sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika, eż. permezz ta' ossidazzjoni.

Proapteni: sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jehilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (14).

Affidabbiltà: Kejljiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riproducibbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riproducibbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (14).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

S.I.: Indiċi ta' Stimolazzjoni. Valuri relattivi tal-intensità medja ġeometrika tal-fluorexxenza f'ċelloli trattati bis-sustanza kimika meta mqabbla ma' ċelloli trattati b'solvent.

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test hliet tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bazi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbliment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma'

kontroll b' medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċifità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (14).

Bafer tat-tilwin: Salina baferjata bil-fosfat li fiha 5 % serum tal-għoġġiela fetali.

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

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

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-għan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (16).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Test validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit (18).

Appendiċi 2.2

SUSTANZI TA' PROFICJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu b'mod korrett it-tbassir mistenni ta' U-SENSTM għall-10 sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri tas-CV70 u tal-EC150 li jaqgħu fi hdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza. Is-sustanzi ta' profiċjenza ntgħażlu biex jirrappreżentaw il-firxa ta' risponsi għal perikli ta' sensitizzazzjoni tal-gilda. Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bit-test U-SENSTM. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għat-test U-SENSTM (1) (8).

Tabella 1: Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bit-test U-SENSTM

Sustanzi ta' profiċjenza	CASRN	Stat fiżiku	Tbassir <i>in vivo</i> ¹	U-SENS TM Solvent/ Veikolu	U-SENS TM Medda ta' Riferiment ta' CV70 f'µg/ml ²	U-SENS TM Medda ta' Riferiment ta' EC150 f'µg/ml ²
4-Fenilenediammina	106-50-3	Solidu	Sensitizzatur (b'sahhtu)	Medium komplut ³	<30	Pożittiv (≤10)
Aċidu sulfoniku pikril	2508-19-2	Likwidu	Sensitizzatur (b'sahhtu)	Medium komplut	>50	Pożittiv (≤50)
Dietilmaleat	141-05-9	Likwidu	Sensitizzatur (moderat)	DMSO	10-100	Pożittiv (≤20)
Resorċinol	108-46-3	Solidu	Sensitizzatur (moderat)	Medium komplut	>100	Pożittiv (≤50)
Alkohol ċinnamiku	104-54-1	Solidu	Sensitizzatur (dghajjef)	DMSO	>100	Pożittiv (10-100)
4-Allilanol	140-67-0	Likwidu	Sensitizzatur (dghajjef)	DMSO	>100	Pożittiv (≤200)
Sakkarina	81-07-2	Solidu	Mhux sensitizzatur	DMSO	>200	Negattiv (>200)
Gliċerol	56-81-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Medium komplut	>200	Negattiv (>200)
Aċidu lattiku	50-21-5	Likwidu	Mhux sensitizzatur	Medium komplut	>200	Negattiv (>200)
Aċidu saliciliku	69-72-7	Solidu	Mhux sensitizzatur	DMSO	>200	Negattiv (>200)

Abbrevjazzjonijiet: RN tas-CAS = Numru tar-Reġistru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

¹ It-tbassir tal-periklu (u tal-potenza) *in vivo* hu bbażat fuq *data* tal-LLNA (1) (8). Il-potenza *in vivo* tinkiseb tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (17).

² Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (1) (8).

³ Medium komplut: Medium RPMI-1640 supplimentat b'10 % serum tal-ġhoġġiela fetali, 2 mM L-glutammīna, 100 unità/ml penicillīna u 100 µg/ml streptomīcīna (8).

Appendiċi 3

SENSITIZZAZZJONI TAL-ĠILDA *IN VITRO*: ASSAĠĠ IL-8 LUC

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

1. Għall-kuntrarju ta' assaġġi li janalizzaw l-espressjoni ta' markaturi tas-superfiċje taċ-ċelloli, l-assaġġ IL8-Luc jikkwantifika t-tibdiliet fl-espressjoni tal-IL-8, ċitokina assoċjata mal-attivazzjoni ta' ċelloli dendritiċi (DC). Fil-linja ta' ċelloli indikatur IL-8 derivata mit-THP-1 (THP-G8, stabbilita mil-linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika akuta umana THP-1), l-espressjoni tal-IL-8 titkejjel wara l-esponiment għal sensitizzaturi (1). Imbagħad l-espressjoni tal-luċiferażi tintuża biex tghin fid-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi.
2. L-assaġġ IL-8 gie evalwat fi studju ta' validazzjoni (2) imwettaq mill-Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (JaCVAM), mill-**Ministeru tal-Ekonomija, tal-Kummerċ u tal-Industrija** (METI), u mill-Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments (JSAAE) u mbagħad gie soġġett għal rieżami bejn il-pari indipendenti (3) taħt l-awspicji tal-JaCVAM u tal-**Ministeru tas-Saħħa, tax-Xogħol u tas-Sigurtà Soċjali** (MHLW) bl-appoġġ tal-**International Cooperation on Alternative Test Methods** (ICATM). B'kunsiderazzjoni tal-evidenza disponibbli kollha u tal-input mir-regolaturi u mill-partijiet ikkonċernati, l-assaġġ IL-8 LUC hu meqjus siewi bħala parti minn IATA għad-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi u n-nonsensitizzaturi għall-fini ta' klassifikazzjoni u ta' tikkettar tal-perikli. Eżempji tal-użu tad-*data* tal-assaġġ IL-8 Luc flimkien ma' informazzjoni ohra huma rapportati fid-dokumentazzjoni (4) (5) (6).
3. L-assaġġ IL-8 Luc wera li kien trasferibbli għal laboratorji esperjenzati fil-koltura taċ-ċelloli u fil-ġestjoni tal-luċiferażi. Ir-riproduċibbiltajiet fi hdan u bejn il-laboratorji kienu ta' 87,7 % u ta' 87,5 %, rispettivament (2). *Data* ġenerata fl-istudju ta' validazzjoni (2) u xogħol ippubblikat ieħor (1) (6) turi li kontra l-LLNA, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 118 minn 143 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u iġġudika 25 sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza tal-assaġġ IL-8 Luc fid-distinzjoni bejn sensitizzaturi tal-ġilda (Kat. 1 tal-GHS tan-NU/tas-CLP) min-nonsensitizzaturi (Ebda Kat. tal-GHS tan-NU/tas-CLP) hi ta' 86 % (101/118) b'sensittività ta' 96 % (92/96) u bi speċifiċità ta' 41 % (9/22). Esklużi sustanzi li jaqgħu barra d-dominju ta' applikabbiltà deskritt hawn taħt (paragrafu 5), l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 113 minn 136 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u iġġudika 23 sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza tal-assaġġ IL-8 Luc hi ta' 89 % (101/103) b'sensittività ta' 96 % (92/96) u bi speċifiċità ta' 53 % (9/17). Bl-użu tad-*data* umana ċċitata f'Urbisch et al. (7), l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 76 minn 90 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u iġġudika 14-il sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-

akkuratezza hi ta' 80 % (61/76) is-sensittività hi ta' 93 % (54/58) u l-ispeċifità hi ta' 39 % (7/18). Esklużi sustanzi li jaqgħu barra d-dominju ta' applikabbiltà, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika 71 minn 84 sustanza kimika bħala pożittivi jew negattivi u iġġudika 13-il sustanza kimika bħala inkonklużivi u l-akkuratezza hi ta' 86 % (61/71) b'sensittività ta' 93 % (54/58) u bi speċifità ta' 54 % (7/13). Il-previżjonijiet ta' negattivi foloz bl-assaġġ IL-8 Luc għandhom probabbiltà akbar li jseħħu b'sustanzi kimiċi li juru potenza baxxa/moderata tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (subkategorija 1B tal-GHS tan-NU/tas-CLP) minn daww b'potenza għolja (subkategorija 1A tal-GHS tan-NU/tas-CLP) (6). F'daqqa, l-informazzjoni ssostni rwol għall-assaġġ IL-8 Luc fl-identifikazzjoni ta' perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda. L-akkuratezza mogħtija għall-assaġġ IL-8 Luc bħala test waħdu hi indikattiva biss peress li t-test għandu jiġi kkunsidrat flimkien ma' sorsi oħra ta' informazzjoni fil-kuntest ta' IATA u skont id-dispożizzjonijiet tal-paragrafi 7 u 8 fl-Introduzzjoni ġenerali. Barra minn hekk, meta jiġu evalwati testijiet mhux fuq l-annimali għas-sensitizzazzjoni tal-ġilda, ta' min jiftakar li l-LLNA kif ukoll testijiet oħra fuq l-annimali jaf ma jirriflettux is-sitwazzjoni sħiħa fil-bniedem.

4. Fuq il-bażi tad-*data* disponibbli bħalissa, intwera li l-assaġġ IL-8 Luc hu applikabbli għal sustanzi kimiċi tat-test li jkopru firxa ta' gruppi funzjonali organiċi, ta' mekkaniżmi ta' reazzjoni, ta' potenza tas-sensitizzazzjoni tal-ġilda (kif stabbiliti fi studji *in vivo*) u ta' proprjetajiet fiżikokimiċi (2) (6).
5. Għalkemm l-assaġġ IL-8 Luc juża X-VIVO™ 15 bħala solvent, hu evalwa korrettament sustanzi kimiċi b'Log K_{ow} >3,5 u daww b'solubbiltà fl-ilma ta' madwar 100 µg/ml kif ikkalkolati b'EPI Suite™ u l-prestazzjoni tiegħu biex jindividwa sensitizzaturi b'solubbiltà batuta fl-ilma hi aħjar minn dik tal-assaġġ IL-8 Luc bl-użu tas-sulfossidu tad-dimetil (DMSO) bħala solvent (2). Madankollu, riżultati negattivi għas-sustanzi kimiċi tat-test li mhumieq dissolti f'20 mg/ml jistgħu jipproduċu riżultati ta' negattivi foloz minhabba n-nuqqas ta' hila tagħhom li jiddissolvu f'X-VIVO™ 15. Għaldaqstant, riżultati negattivi għal dawn is-sustanzi kimiċi ma għandhomx jiġu kkunsidrati. Fl-istudju ta' validazzjoni għet osservata rata għolja ta' negattivi foloz għall-anidridi. Barra minn hekk, minhabba l-kapaċità metabolika limitata tal-linja ta' ċelloli (8) u l-kundizzjonijiet esperimentali, il-proapteni (sustanzi li jeħtiegu attivazzjoni metabolika) u l-preapteni (sustanzi attivati bl-ossidazzjoni tal-arja) jistgħu jagħtu riżultati negattivi fl-assaġġ. Madankollu, għalkemm ir-riżultati negattivi għal pre/proapteni suspettati għandhom jiġu interpretati b'attenzjoni, l-assaġġ IL-8 Luc iġġudika korrettament 11 minn 11-il preapten, 6/6 proapteni, u 6/8 pre/proapteni fis-sett ta' *data* tal-assaġġ IL-8 Luc (2). Fuq il-bażi tar-rieżami komprensiv riċenti fuq tliet testijiet mhux fuq l-annimali (id-DPRA, il-KeratinoSens™ u l-h-CLAT) biex jiġu individwati pre u proapteni (9), u fuq il-bażi tal-fatt li ċ-ċelloli THP-G8 użati fl-assaġġ IL-8 Luc huma linja ta' ċelloli derivata mit-THP-1 li tintuża fl-h-CLAT, l-assaġġ IL-8 Luc jista' jikkontribwixxi wkoll biex tiżdied is-sensittività ta' testijiet mhux fuq l-

animali biex jindividwaw pre u proapteni fit-tahlita ta' testijiet oħra. It-tensjoattivi ttestjati s'issa taw riżultati pożittivi (foloz) indipendentement mit-tip tagħhom (eż. katjoniċi, anjoniċi jew onjoniċi). Finalment sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-luċiferażi jistgħu jhawdu l-attività/il-kejl tagħha, u jikkawżaw inibizzjoni apparenti jew luminexxenza akbar (10). Pereżempju, konċentrazzjonijiet ta' fitoestrogeni akbar minn 1 μ M ġew rapportati li jinterferixxu ma' sinjali ta' luminexxenza f'assaġġi oħra tal-ġene indikatur abbażi tal-luċiferażi minħabba sovrattivazzjoni tal-ġene indikatur tal-luċiferażi. Bħala konsegwenza, l-espressjoni tal-luċiferażi miksuba f'konċentrazzjonijiet għoljin ta' fitoestrogeni jew ta' komposti suspettati li jipproduċu attivazzjoni simili għall-fitoestrogeni tal-ġene indikatur tal-luċiferażi trid tiġi eżaminata bir-reqqa (11). Fuq il-bażi ta' dan li ntqal hawn fuq, tensjoattivi, anidridi u sustanzi kimiċi li jinterferixxu mal-luċiferażi jaqgħu barra mid-dominju ta' applikabbiltà ta' dan l-assaġġ. F'każijiet li fihom ikun hemm evidenza li turi n-nuqqas ta' applikabbiltà tal-assaġġ IL-8 Luc għal kategoriji speċifiċi oħra ta' sustanzi kimiċi tat-test, it-test ma għandux jintuża għal dawk il-kategoriji speċifiċi.

6. Kif deskritt aktar 'il fuq, l-assaġġ IL-8 Luc isostni d-diskriminazzjoni bejn is-sensitizzaturi tal-ġilda u n-nonsensitizzaturi. Hu meħtieġ aktar xogħol, idealment fuq il-bażi ta' *data* umana, biex jiġi determinat jekk ir-riżultati tal-IL-8 Luc jistgħux jikkontribwixxu għall-valutazzjoni tal-potenza meta meqjusa flimkien ma' sorsi ta' informazzjoni oħra.
7. Id-definizzjonijiet huma pprovduti fl-Appendiċi 3.1.

PRINĊIPJU TAT-TEST

8. L-assaġġ IL-8 jagħmel użu minn linja ta' ċelloli tal-lewkimja monoċitika umana THP-1 li nkisbet mingħand l-American Type Culture Collection (Manassas, VA, l-Istati Uniti). Bl-użu ta' din il-linja ta' ċelloli, id-Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine, stabbilixxa linja ta' ċelloli indikatur tal-IL-8 derivata mit-THP-1, THP-G8, li thaddan fiha l-ġeni tal-luċiferażi Luċiferażi Stabbli Oranġjo (SLO) u l-Luċiferażi Stabbli Hamra (SLR) taħt il-kontroll tal-IL-8 u promoturi tal-gliċeraldeid 3-fosfat deidrogenasi (GAPDH), rispettivament (1). Dan jippermetti l-kejl kwantitattiv tal-induzzjoni tal-ġeni tal-luċiferażi bid-detezzjoni tal-luminexxenza minn substrati tal-luċiferażi ferm stabbiliti li jipproduċu d-dawl bħala indikatur tal-attività tal-IL-8 u tal-GAPDH fiċ-ċelloli wara l-esponiment għal sustanzi kimiċi sensitizzanti.
9. Is-sistema ta' assaġġ b'kulur doppju tinvolvi luċiferażi li temetti l-oranġjo (SLO; $\lambda_{\text{mass}} = 580 \text{ nm}$) (12) għall-espressjoni ġenika tal-promotur tal-IL-8 kif ukoll luċiferażi li temetti l-aħmar (SLR; $\lambda_{\text{mass}} = 630 \text{ nm}$) (13) għall-espressjoni ġenika tal-promotur tal-kontroll intern, GAPDH. Iż-żewġ luċiferażijiet jemmettu kuluri differenti malli jirreagixxu mal-

luċiferina-d tal-fireflies u l-luminexxenza tagħhom titkejjel b'mod simultanju f'reazzjoni bi stadju wiehed billi l-emissjoni tiġi diviża mit-taħlita tal-assaġġ bl-użu ta' filtru ottiku (14) (Appendiċi 3.2).

10. Iċ-ċelloli THP-G8 huma trattati għal 16-il siegħa bis-sustanza kimika tat-test, u wara dan jitkejlu l-attività tal-luċiferażi tal-SLO (SLO-LA) li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8 u l-attività tal-luċiferażi tal-SLR (SLR-LA) li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH. Biex l-abbrevjazzjonijiet ikunu jistgħu jinftiehm fuq faċilment, SLO-LA u SLR-LA huma msemmija IL8LA u GAPLA, rispettivament. It-Tabella 1 tagħti deskrizzjoni tat-termini assoċjati mal-attività tal-luċiferażi fl-assaġġ IL-8 Luc. Il-valuri mkejla jintużaw biex tiġi kkalkolata l-IL8LA normalizzata (nIL8LA), li hi l-proporzjon tal-IL8LA għall-GAPLA; l-induzzjoni tal-nIL8LA (Ind-IL8LA), li hi l-proporzjon tal-medji aritmetiċi tal-valuri mkejla kwadrupli tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanza kimika tat-test u l-valuri tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 mhux trattati; u l-inibizzjoni tal-GAPLA (Inh-GAPLA), li hi l-proporzjon tal-medji aritmetiċi tal-valuri mkejla kwadrupli tal-GAPLA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanza kimika tat-test u l-valuri tal-GAPLA taċ-ċelloli THP-G8 mhux trattati, u użati bħala indikatur għaċ-ċitotossicità.

Tabella 1: Deskrizzjoni tat-termini assoċjati mal-attività tal-luċiferażi fl-assaġġ IL-8 Luc

Abbrevjazzjo nijiet	Definizzjoni
GAPLA	Attività ta' luċiferażi tal-SLR li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH
IL8LA	Attività ta' luċiferażi tal-SLO li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi / nIL8LA taċ-ċelloli mhux trattati
Inh-GAPLA	GAPLA tat-THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi / GAPLA taċ-ċelloli mhux trattati
CV05	L-anqas konċentrazzjoni tas-sustanza kimika li fiha Inh-GAPLA ssir < 0,05.

11. L-istandards tal-prestazzjoni (PS) (15) huma disponibbli biex tiġi faċilitata l-validazzjoni tat-testijiet modifikati *in vitro* tal-luċiferażi tal-IL-8 simili għall-assaġġ IL-8 Luc u jippermettu l-emendar fil-hin tal-Linja Gwida tat-Test 442E tal-OECD għall-inklużjoni tagħhom. Aċċettazzjoni Reċiproka tad-Data (MAD) mill-OECD se tkun garantita biss għal testijiet validati skont il-PS, jekk dawn it-testijiet ikunu ġew rieżaminati u inklużi fil-Linja Gwida tat-Test 442E mill-OECD (16).

WIRI TAL-PROFIĊJENZA

12. Qabel ma jużaw it-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71 b'hala rutina, il-laboratorji għandhom juru l-profiċjenza teknika billi jużaw l-10 Sustanzi ta' Profiċjenza elenkati fl-Appendiċi 3.3 f'konformità mal-Prattiki Tajba tal-Metodi *in vitro* (11). Barra minn hekk, l-utenti tat-test għandhom iżommu bażi ta' *data* storika tad-*data* generata bil-kontrolli tar-reattività (ara l-paragrafu 15) u bil-kontrolli pożittivi u b'solvent/b'veikolu (ara l-paragrafi 21-24), u jużaw din id-*data* biex jikkonfermaw ir-riproduċibbiltà tat-test fil-laboratorju tagħhom tinżamm maż-żmien.

PROCEDURA

13. Il-Proċedura Operattiva Standard (SOP) għall-assaġġ IL-8 Luc hi disponibbli u għandha tithaddem meta jitwettag it-test (18). Il-laboratorji li lesti li jwettqu t-test jistgħu jiksbu l-linja ta' ċelloli rikombinanti THP-G8 mill-GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, il-Ġappun, wara li jiffirmaw Ftehim ta' Trasferiment tal-Materjal (MTA) f'konformità mal-kundizzjonijiet tal-mudell tal-OECD. Il-paragrafi li ġejjin jipprovdu deskrizzjoni tal-komponenti u tal-proċeduri ewlenin tal-assaġġ.

Thejjija taċ-ċelloli

14. Il-linja ta' ċelloli THP-G8 mill-GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, il-Ġappun, għandha tintuża għat-twettag tal-assaġġ IL-8 Luc (ara l-paragrafi 8 u 13). Malli jiġu riċevuti, iċ-ċelloli jiġu propagati (2-4 passigġieri) u jinħażnu ffrizati b'hala stokk omogenu. Iċ-ċelloli minn dan l-istokk jistgħu jiġu propagati sa massimu ta' 12-il passaġġ jew sa massimu ta' 6 ġimghat. Il-medium użat għall-propagazzjoni hu l-medium tat-tkabbir RPMI-1640 li fih 10 % serum tal-bovini fetali (FBS), soluzzjoni antibijotika/antimikotika (100U/ml peniċillina G, 100µg/ml streptomċina u 0,25µg/ml amfoteriċina B f'0,85 % salina) (eż. GIBCO Cat#15240-062), 0,15µg/ml Puromiċina (eż. CAS:58-58-2) u 300µg/ml G418 (eż. CAS:108321-42-2).
15. Qabel ma jintużaw għall-ittestjar, iċ-ċelloli għandhom jiġu kwalifikati billi jsir kontroll tar-reattività. Dan il-kontroll għandu jsir ġimgha/ġimagħtejn jew 2-4 passaġġi wara t-taħlil, bl-użu tal-kontroll pożittiv, 4-nitrobenzil bromur (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99 % purità) u l-kontroll negattiv, aċidu lattiku (LA) (CAS:50-21-5, ≥85 % purità). 4-NBB għandu jipproduċi rispons pożittiv għall-Ind-IL8LA (≥1,4), filwaqt li l-LA għandu jipproduċi rispons negattiv għall-Ind-IL8LA (<1,4). Huma biss iċ-ċelloli li jgħaddu mill-kontroll tar-reattività li jintużaw għall-assaġġ. Il-kontroll għandu jsir skont il-proċeduri deskritti fil-paragrafi 22-24.
16. Għall-ittestjar, iċ-ċelloli THP-G8 jinżerġu f'densità ta' 2 sa 5×10^5 ċelloli/ml, u jiġu prekolturati f' flasks tal-koltura għal għal 48 sa 96 siegħa. Fil-jum tat-test, iċ-ċelloli miġbura mill-flask tal-koltura jinħaslu bl-RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS mingħajr ebda

antibijotiku, u mbagħad jerġgħu jiġu sospizi b'RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS mingħajr ebda antibijotiku f' 1×10^6 ċelloli/ml. Imbagħad, iċ-ċelloli jitqassmu fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (eż. Costar Cat#3603) b'50 μ l (5×10^4 ċelloli/bwejra).

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

17. Is-sustanza kimika tat-test u s-sustanzi tal-kontroll jithejjew dakinhar tal-ittestjar. Għall-assaġġ IL-8 Luc, is-sustanzi kimiċi tat-test jiġu dissolti f'X-VIVO™ 15, medium hieles mis-serum disponibbli kummerċjalment (Lonza, 04-418Q), għall-konċentrazzjoni finali ta' 20 mg/ml. X-VIVO™ 15 jiżdied ma' 20 mg tas-sustanza kimika tat-test (indipendentement mis-solubbiltà tas-sustanza kimika) f'tubu tal-mikrocentrifugazzjoni u jingieb għal volum ta' 1ml u mbagħad jiġi vortifikat bis-saħħa u jithawwad fuq rotor b'veloċità massima ta' 8 rpm għal 30 min f'temperatura ambjentali ta' madwar 20°C. Barra minn hekk, jekk is-sustanzi kimiċi solidi jibqgħu insolubbli, it-tubu jiġi sonikat sakemm is-sustanza kimika tid-disolvi kompletament jew tiġi dispersa b'mod stabbli. Għal sustanzi kimiċi tat-test solubbli f'X-VIVO™ 15, is-soluzzjoni tiġi dilwita b'fattur ta' 5 b'X-VIVO™ 15 u tintuża bħala soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanza kimika tat-test (4 mg/ml). Għal sustanzi kimiċi tat-test mhux solubbli f'X-VIVO™ 15, it-taħlita terġa' tiġi rotata għal tal-anqas 30 min, u mbagħad ċentrifugata fi 15,000 rpm ($\approx 20\,000g$) għal 5 min; is-supernatant li jirriżulta jintuża bħala soluzzjoni ewlenija X-VIVO™ 15 tas-sustanza kimika tat-test. Għandha tiġi pprovduta motivazzjoni xjentifika għall-użu ta' solventi oħra, bħal DMSO, ilma, jew il-medium tat-tkabbir. Il-proċedura dettaljata għad-dissoluzzjoni tas-sustanzi kimiċi hi murija fl-Appendiċi 3.5. Is-soluzzjonijiet ta' X-VIVO™ 15 deskritti fil-paragrafi 18-23 jithalltu 1:1 (v/v) mas-sospensjonijiet taċ-ċelloli mhejjija fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (ara l-paragrafu 16).
18. L-ewwel sessjoni tat-test għandha l-għan li tiddetermina l-konċentrazzjoni ċitotossika u li teżamina l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda tas-sustanzi kimiċi. Bl-użu ta' X-VIVO™ 15, id-dilwizzjonijiet serjali tas-soluzzjonijiet ewlenin ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanzi kimiċi tat-test isiru b'fattur ta' dilwizzjoni ta' tnejn (ara l-Appendiċi 3.5) bl-użu ta' blokk tal-assaġġ b'96 bwejra (eż. Costar Cat#EW-01729-03). Imbagħad, 50 μ l/bwejra tas-soluzzjoni dilwita tiżdied ma' 50 μ l tas-sospensjoni taċ-ċelloli fi pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. B'hekk, għal sustanzi kimiċi tat-test li huma solubbli f'X-VIVO™ 15, il-konċentrazzjonijiet finali tas-sustanzi kimiċi tat-test ivarjaw minn 0,002 sa 2 mg/ml (Appendiċi 3.5). Għal sustanzi kimiċi tat-test li mhumx solubbli f'X-VIVO™ 15 f'20 mg/ml, fatturi ta' dilwizzjoni li jvarjaw minn 2 sa 2^{10} biss jiġu determinati, għalkemm il-konċentrazzjonijiet finali attwali tas-sustanzi kimiċi tat-test jibqgħu incerti u jiddependu mill-konċentrazzjoni saturata tas-sustanzi kimiċi tat-test fl-X-VIVO™ 15.
19. F'sessjonijiet tat-test sussegwenti (jiġifieri t-tieni, it-tielet u r-raba' repliki), is-soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ issir fil-konċentrazzjoni 4 darbiet oghla mill-konċentrazzjoni tal-

vijabbiltà tač-ċelloli 05 (CV05; l-anqas konċentrazzjoni li fiha l-Inh-GAPLA ssir <0,05) fl-ewwel esperiment. Jekk Inh-GAPLA ma tonqosx f'livell anqas minn 0,05 fl-oghla konċentrazzjoni fl-ewwel sessjoni, is-soluzzjoni ewlenija ta' X-VIVO™ 15 issir fl-oghla konċentrazzjoni tal-ewwel sessjoni. Il-konċentrazzjoni ta' CV05 tiġi kkalkolata bid-diviżjoni tal-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija fl-ewwel sessjoni b'fattur ta' dilwizzjoni għas-CV05 (X) (fattur ta' dilwizzjoni CV05 (X); il-fattur ta' dilwizzjoni meħtieġ biex tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija għas-CV05) (ara l-Appendiċi 3.5). Għal sustanzi tat-test mhux solubbli f'X-VIVO f'20 mg/ml, is-CV05 tiġi determinata bil-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija x 1/X. Għas-sessjonijiet 2 sa 4, it-tieni soluzzjoni ewlenija tithejja bħala 4 x CV50 (Appendiċi 3.5).

20. Dilwizzjonijiet serjali tat-tieni soluzzjonijiet ewlenin ta' X-VIVO™ 15 jithejjew b'fattur ta' dilwizzjoni ta' 1,5 bl-użu ta' blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Imbagħad, 50 µl/bwejra tas-soluzzjoni dilwita tiżdied ma' 50 µl tas-sospensjoni tač-ċelloli fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. Kull konċentrazzjoni ta' kull sustanza kimika tat-test għandha tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Imbagħad il-kampjuni jithalltu fuq xejker tal-pjastri u jiġu inkubati għal 16-il siegħa f'37°C u f'5 % CO₂, u wara dan titkejjel l-attività tal-luċiferażi kif deskritt hawn taht.
21. Il-kontroll b'solvent hu t-taħlita ta' 50 µl/bwejra ta' X-VIVO™ 15 u 50 µl/bwejra ta' sospensjoni tač-ċelloli fl-RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS.
22. Il-kontroll pożittiv rakkomandat hu 4-NBB. 20 mg ta' 4-NBB jithejja f'tubu tal-mikrofuġju ta' 1,5-ml, li miegħu jiżdied sa 1 ml X-VIVO™ 15. It-tubu jiġi vorticiifikat bis-saħħa u jithawwad fuq rotor b'veloċità massima ta' 8 rpm għal tal-anqas 30 min. Wara ċ-ċentrifugazzjoni f'20 000g għal 5 min, is-supernatant jiġi dilwit b'fattur ta' 4 b'X-VIVO™ 15, u 500 µl tas-supernatant dilwit jiġi trasferit fi bwejra fi blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Is-supernatant dilwit jiġi dilwit aktar b'X-VIVO™ 15 f'fatturi ta' 2 u 4, u tiżdied 50 µl tas-soluzzjoni ma' 50 µl tas-sospensjoni tač-ċelloli THP-G8 fil-bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra (Appendiċi 3.6). Kull konċentrazzjoni tal-kontroll pożittiv għandha tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Il-pjastra tithežżeż fuq xejker tal-pjastri, u tiġi inkubata f'inkubatur tas-CO₂ għal 16-il siegħa (37°C, 5 % CO₂), u wara dan l-attività tal-luċiferażi titkejjel kif deskritt fil-paragrafu 29.
23. Il-kontroll negattiv rakkomandat hu l-LA. 20 mg LA mhejji f'tubu tal-mikrofuġju ta' 1,5-ml, li miegħu jiżdied sa 1 ml (20 mg/ml) X-VIVO™ 15. Soluzzjoni ta' 20 mg/ml LA tiġi dilwita b'fattur ta' 5 b'X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); 500 µl ta' din is-soluzzjoni 4 mg/ml LA tiġi trasferita fi bwejra ta' blokka tal-assaġġ b'96 bwejra. Din is-soluzzjoni tiġi dilwita b'fattur ta' 2 b'X-VIVO™ 15 u mbagħad terġa' tiġi dilwita b'fattur ta' 2 biex tipproduċi soluzzjonijiet ta' 2 mg/ml u ta' 1 mg/ml. 50 µl ta' dawn it-tliet soluzzjonijiet u l-kontroll b'veikolu (X-VIVO™ 15) jiżdiedu ma' 50 µl ta' sospensjoni tač-ċelloli THP-G8 fil-

bwejriet ta' pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra. Kull konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv tiġi ttestjata f'erba' bwejriet. Il-pjastra tithežżeż fuq xejker tal-pjastri, u tiġi inkubata f'inkubatur tas-CO₂ għal 16-il siegħa (37°C, 5 % CO₂), u wara dan l-attività tal-luċiferażi titkejjel kif deskritt fil-paragrafu 29.

24. Jistgħu jintużaw kontrolli pożittivi jew negattivi xierqa oħra jekk ikun hemm *data* storika disponibbli biex jiġu derivati kriterji ta' aċċettazzjoni ta' sessjonijiet komparabbli.
25. Għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata l-evaporazzjoni ta' sustanzi kimiċi tat-test volatili u kontaminazzjoni kroċjata bejn bwejriet minn sustanzi kimiċi tat-test, eż. billi l-pjastra tiġi ssiġillata qabel l-inkubazzjoni bis-sustanzi kimiċi tat-test.
26. Is-sustanzi kimiċi tat-test u l-kontroll b'solvent jeħtieġu minn tnejn sa erba' sessjonijiet biex jinkiseb tbassir pożittiv jew negattiv (ara t-Tabella 2). Kull sessjoni ssir f'għurnata differenti b'soluzzjoni ewlenija ġdida ta' X-VIVO™ 15 tas-sustanzi kimiċi tat-test u ta' ċelloli miġbura indipendentement. Iċ-ċelloli jistgħu jkunu ġejjin mill-istess passaġġ.

Kejljiet tal-attività tal-luċiferażi

27. Il-luminexxenza titkejjel bl-użu ta' luminometru tal-mikropjastri b'96 bwejra mġhammra b'filtri ottiċi, eż. Phelios (ATTO, Tokyo, il-Ġappun), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, il-Ġermanja) u s-serje ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, l-Istati Uniti). Il-luminometru jrid jiġi kalibrat għal kull test biex tiġi żgurata riproducibbiltà (19). Il-luċiferażijiet rikombinanti li jemmettu l-oranġjo u l-aħmar huma disponibbli għal dan il-kalibrar.
28. 100µl tar-reagent tal-assaġġ tal-Luċiferażi msaħħan bil-lest Tripluc® (Tripluc) jiġi trasferit f'kull bwejra tal-pjastra li jkun fiha s-sospensjoni ta' ċelloli trattata b'sustanza kimika jew mingħajr. Il-pjastra tithežżeż għal 10 min f'temperatura ambejntali ta' madwar 20°C. Il-pjastra titqiegħed fil-luminometru biex titkejjel l-attività tal-luċiferażi. Il-bijoluminexxenza titkejjel għal 3 sek kull waħda fin-nuqqas (F0) u fil-preżenza (F1) tal-filtru ottiku. Għandha tiġi pprovduta ġustifikazzjoni għall-użu ta' ssettjar alternattiv, eż. skont il-mudell tal-luminometru użat.
29. Il-parametri għal kull konċentrazzjoni jiġu kkalkolati mill-valuri mkejla, eż. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, ±SD medja tal-IL8LA, ±SD medja tal-GAPLA, ±SD medja tal-nIL8LA, ±SD medja tal-Ind-IL8LA, ±SD medja tal-Inh-GAPLA, u l-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA. Id-definizzjonijiet tal-parametri użati f'dan il-paragrafu huma pprovduti fl-Appendiċijiet I u IV, rispettivament.
30. Qabel il-kejl, id-diskriminazzjoni tal-kulur f'assaġġi indikatur b'diversi kuluri ġeneralment tinkiseb bl-użu ta' detetturi (luminometru u apparati għall-qari tal-pjastri) mġhammra b'filtri ottiċi, bħal filtri sharp-cut (long-pass jew short-pass) jew filtri band-pass. Il-

koeffiċjenti ta' trażmissjoni tal-filtri għal kull kulur tas-sinjali tal-bijoluminexxenza għandhom jiġu kalibrati qabel kull test, skont l-Appendiċi 3.2.

DATA U RAPPORTAR

Evalwazzjoni tad-Data

31. Il-kriterji għal deċiżjoni pożittiva/negattiva jehtieġu li f'kull sessjoni:

- tbassir tal-assaġġ IL-8 Luc jiġi ġġudikat pożittiv jekk sustanza kimika tat-test ikollha Ind-IL8LA $\geq 1,4$ u l-limitu inferjuri tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA $\geq 1,0$
- tbassir tal-assaġġ IL-8 Luc jiġi ġġudikat negattiv jekk sustanza kimika tat-test ikollha Ind-IL8LA $< 1,4$ u/jew il-limitu inferjuri tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA $< 1,0$

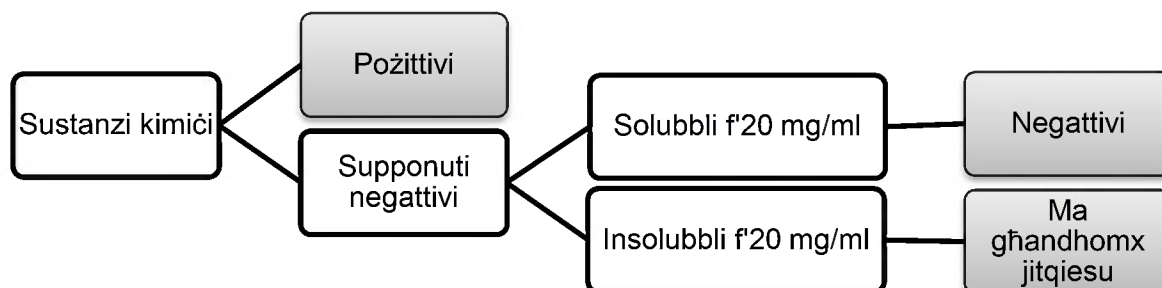
Mudell ta' tbassir

32. Is-sustanzi kimiċi tat-test li jipprovdu żewġ riżultati pożittivi minn fost l-1el, it-2ni, it-3et jew ir-4a sessjoni jiġu identifikati bħala pożittivi filwaqt li daww li jagħtu tliet riżultati negattivi minn fost l-1el, it-2ni, it-3et jew ir-4a sessjoni jiġu identifikati bħala supponuti negattivi (Tabella 2). Fost is-sustanzi kimiċi supponuti negattivi, is-sustanzi kimiċi li jiġu dissolti f'20 mg/ml ta' X-VOVO™ 15 huma ġġudikati bħala negattivi, filwaqt li s-sustanzi kimiċi li ma jiġux dissolti f'20 mg/ml ta' X-VOVO™ 15 ma għandhomx jiġu kkunsidrati (Figura 1).

Tabella 2: Kriterji għall-identifikazzjoni tal-pożittivi u tas-supponuti negattivi

L-1el sessjoni	It-2ni sessjoni	It-3et sessjoni	Ir-4a sessjoni	Tbassir finali
Pożittiv	Pożittiv	-	-	Pożittiv
	Negattiv	Pożittiv	-	Pożittiv
		Negattiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
Negattiv	Pożittiv	Pożittiv	-	Pożittiv
		Negattiv	Pożittiv	Pożittiv
			Negattiv	Supponut Negattiv
	Negattiv	Pożittiv	Pożittiv	Pożittiv
		Negattiv	Pożittiv	Supponut Negattiv
			-	Supponut Negattiv

Figura 1: Mudell ta' tbassir għall-ġudizzju finali



Kriterji ta' aċċettazzjoni

33. Għandhom jiġu ssodisfati l-kriterji ta' aċċettazzjoni li ġejjin meta jintuża l-assaġġ IL-8 Luc:

- Ind-IL8LA għandha tkun aktar minn 5,0 f'tal-anqas konċentrazzjoni waħda tal-kontroll pożittiv, 4-NBB, f'kull sessjoni.
- Ind-IL8LA għandha tkun anqas minn 1,4 fi kwalunkwe konċentrazzjoni tal-kontroll negattiv, aċidu lattiku, f'kull sessjoni.
- Id-*data* mill-pjastri li għalihom il-GAPLA tal-bwejrjet tal-kontroll b'ċelloli u bi Tripluc iżda mingħajr sustanzi kimiċi tkun anqas minn 5 darbiet dik ta' bwejra li jkun fiha l-medium tat-test biss (50 µl/bwejra RPMI-1640 li jkun fih 10 % FBS u 50 µl/bwejra X-VIVO™ 15) għandha tiġi rifjutata.
- Id-*data* mill-pjastri li għalihom l-Inh-GAPLA tal-konċentrazzjonijiet kollha tas-sustanzi kimiċi tat-test jew tal-kontroll tkun anqas minn 0,05 għandha tiġi rifjutata. F'dan il-każ, l-ewwel test għandu jiġi ripetut biex l-oġġet konċentrazzjoni finali tat-test ripetutt tkun l-anqas konċentrazzjoni finali tat-test preċedenti.

Rapport tat-test

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

Sustanzi kimiċi tat-test

Sustanza monokostitwenti:

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;

- Id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritàjiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ.;
- It-trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Is-solubbiltà f'X-VIVO™ 15. Għal sustanzi kimiċi li huma insolubbli f'X-VIVO™ 15, jekk jiġux osservati preċipitazzjoni jew flotazzjoni wara ċ-ċentrifugazzjoni;
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test jekk ma jintużax X-VIVO™ 15.

Sustanza multikostitwenti, UVCB u tahlita:

- Karatterizzazzjoni sa fejn possibbli, eż. bl-identità kimika (ara aktar 'il fuq), il-purità, l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti tal-kostitwenti (ara aktar 'il fuq) tal-kostitwenti, sa fejn ikunu disponibbli;
- Id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma u proprjetajiet fizikokimiċi 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);
- Is-solubbiltà f'X-VIVO™ 15. Għal sustanzi kimiċi li huma insolubbli f'X-VIVO™ 15, jekk jiġux osservati preċipitazzjoni jew flotazzjoni wara ċ-ċentrifugazzjoni;
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli.
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent/tal-veikolu għal kull sustanza kimika tat-test jekk ma jintużax X-VIVO™ 15.

Kontrolli

Kontroll pożittiv:

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem (jew ismijiet) IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, il-kodiċi SMILES jew InChI, il-formula strutturali, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Id-dehra fizika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fizikokimiċi rilevanti addizzjonali, meta jkunu disponibbli u fejn applikabbli;

- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Trattament qabel l-ittestjar, jekk applikabbli (pereżempju tishin, thin);
- Il-konċentrazzjoni(jiet) ittestjata/i;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Referenza għar-riżultati storiċi tal-kontroll pożittiv li juru kriterji xierqa ta' aċċettazzjoni, jekk applikabbli.

Kontroll negattiv:

- Identifikazzjoni kimika, bħall-isem/ismijiet IUPAC jew CAS, in-numru/i CAS, u/jew identifikaturi oħrajn;
- Il-purità, l-identità kimika tal-impuritajiet kif xieraq u fattibbli fil-prattika, eċċ;
- Id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, il-piż molekulari, u proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali f'każ li jintużaw kontrolli negattivi oħra li ma jkunux fost daww imsemmijin fil-Linja Gwida tat-Test u sa fejn ikunu disponibbli;
- Il-kundizzjonijiet tal-ħżin u l-istabbiltà, sa fejn ikunu disponibbli;
- Ġustifikazzjoni għall-għażla tas-solvent għal kull sustanza kimika tat-test;

Il-kundizzjonijiet tat-test

- L-isem u l-indirizz tal-isponsor, tal-faċilità tat-test u tad-direttur tal-istudju;
- Deskrizzjoni tat-test użat;
- Il-linja ta' ċelloli użata, il-kundizzjonijiet tal-ħżin u s-sors tagħha (eż. il-faċilità mnejn inkisbet);
- In-numru tal-lott u l-orijini tal-FBC, isem il-fornitur, in-numru tal-lott tal-pjastra sewda b'qiegħ ċatt b'96 bwejra, u n-numru tal-lott tar-reagent Tripluc;
- In-numru ta' passaġġi u d-densità taċ-ċelloli użati għall-ittestjar;
- Il-metodu ta' għadd taċ-ċelloli għat-tiżriġ qabel l-ittestjar u l-miżuri meħudin biex tiġi żgurata distribuzzjoni omogena tan-numru ta' ċelloli;
- Il-luminometru użat (eż. il-mudell), inklużi l-issettjar tal-istrument, is-sustrat ta' luċiferażi użat, u wiri tal-kejljiet ta' luminexxenza xierqa fuq il-bażi tat-test tal-kontroll deskritt fl-Appendiċi 3.2;
- Il-proċedura użata biex tintwera l-profiċjenza tal-laboratorju biex iwettaq it-test (eż. billi jiġu ttestjati s-sustanzi ta' profiċjenza) jew biex tintwera prestazzjoni riproduttibbli tat-test matul iż-żmien.

Il-proċedura tat-test

- In-numru ta' repliki u ta' sessjonijiet imwettqa;
- Il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test, il-proċedura ta' applikazzjoni u l-ħin ta' esponiment (jekk ikunu differenti minn dawk rakkomandati);
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' evalwazzjoni u ta' deċiżjoni użati;
- Deskrizzjoni tal-kriterji ta' aċċettazzjoni tal-istudju użati;
- Deskrizzjoni ta' kwalunkwe modifika tal-proċedura tat-test.

Ir-riżultati

- Il-kejljiet tal-IL8LA u tal-GAPLA;
- Il-kalkoli għall-nIL8LA, għall-Ind-IL8LA, u għall-Inh-GAPLA;
- L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tal-Ind-IL8LA;
- Graff li turi l-kurvi ta' doża-rispons għall-induzzjoni tal-attività tal-luċiferażi u għall-vijabbiltà;
- Deskrizzjoni ta' kull osservazzjoni rilevanti oħra osservata, jekk applikabbli.

Diskussjoni tar-riżultati

- Diskussjoni tar-riżultati miksuba bl-assaġġ IL-8 Luc;
- Kunsiderazzjoni tar-riżultati tal-assaġġ fil-kuntest ta' IATA, jekk ikun hemm informazzjoni rilevanti oħra disponibbli.

Konklużjoni

DOKUMENTAZZJONI

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, u Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, u Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, u Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, u Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, u Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Parigi. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, u Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, u Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, u Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Parigi, Franza
- (16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Parigi, Franza.
- (17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organizzazzjoni għall-

Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi. Disponibbli fuq:
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf.

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Disponibbli fuq:
http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, u Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Pariġi, Franza.
- (21) In-Nazzjonijiet Uniti (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponibbli fuq:
http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

Appendiċi 3.1

DEFINIZZJONIJIET

Akkuratezza: Il-qrubija fil-livell ta' qbil bejn ir-riżultati tat-test u l-valuri referenzjarji aċċettati. Hi kejl tal-prestazzjoni tat-test u wieħed mill-aspetti ta' rilevanza. Spiss it-terminu jintuża b'mod alternanti ma' "konkordanza" biex ifisser il-proporzjon ta' riżultati korretti ta' test (16).

AOP (Passaġġ tal-Eżitu Avvers): Sekwenza ta' avvenimenti mill-istruttura kimika ta' sustanza kimika fil-mira jew grupp ta' sustanzi kimiċi simili permezz tal-avveniment ta' inizjazzjoni molekulari għal eżitu ta' interess *in vivo* (22).

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

CV05: Il-vijabbiltà taċ-ċelloli 05, jiġifieri l-konċentrazzjoni minima li fiha s-sustanzi kimiċi juru anqas minn 0,05 tal-Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-Ind-IL8LA. Ara Ind-IL8LA għad-definizzjoni.

GAPLA: Attività tal-Luċiferażi tal-Luċiferażi Hamra Stabbli (SLR) ($\lambda_{\text{mass}} = 630 \text{ nm}$), regolata mill-promotur tal-GAPDH u turi l-vijabbiltà taċ-ċelloli u n-numru ta' ċelloli vijabbli.

Periklu: Proprjetà inerenti ta' agent jew ta' sitwazzjoni li għandha l-potenzjal li tikkawża 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 ta' grupp ta' sustanzi kimiċi, li jintegra b'mod strutturat u jiżen id-*data* rilevanti kollha biex jinforma deċiżjoni regolatorja dwar il-periklu u/jew ir-riskju u/jew il-htieġa potenzjali għal ittestjar immirat ulterjuri li, għaldaqstant, ikun minimu.

II-SLR-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-Inh-GAPLA. Ara Inh-GAPLA għad-definizzjoni.

IL-8 (Interlewkina-8): Ċitokina derivata minn ċelloli endoteljali, minn fibroblasti, minn keratinoċiti, minn makrofagi, u minn monoċiti li tikkawża kemotassi tan-newtrofili u tal-linfoċiti taċ-ċelloli-T.

IL8LA: Attività tal-Luċiferażi tal-Luċiferażi Orangjo Stabbli (SLO) ($\lambda_{\text{mass}} = 580 \text{ nm}$), regolata mill-promotur tal-IL-8.

Ind-IL8LA: Induzzjoni ta' drabi tal-IL8LA. Tinkiseb bid-diviżjoni tal-nIL8LA taċ-ċelloli THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi b'dik ta' ċelloli THP-G8 mhux stimolati u tirrappreżenta l-induzzjoni tal-attività tal-promotur tal-IL-8 mis-sustanzi kimiċi.

Inh-GAPLA: Inibizzjoni tal-GAPLA. Tinkiseb bid-diviżjoni tal-GAPLA tat-THP-G8 trattati b'sustanzi kimiċi b'GAPLA ta' THP-G8 mhux trattati u tirrappreżenta ċ-ċitotossicità tas-sustanzi kimiċi.

Limitu minimu ta' induzzjoni (MIT): l-anqas konċentrazzjoni li fiha sustanza kimika tissodisfa l-kriterji pożittivi

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

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

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

nIL8LA: L-attività tal-luċiferażi SLO li tirrifletti l-attività promotur tal-IL-8 (IL8LA) normalizzata bl-attività tal-luċiferażi SLR li tirrifletti l-attività promotur tal-GAPDH (GAPLA). Din tirrappreżenta l-attività promotur tal-IL-8 wara li tikkunsidra l-vijabbiltà taċ-ċelloli jew in-numru ta' ċelloli.

nSLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-nIL8LA. Ara nIL8LA għad-definizzjoni.

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

Preapteni: Sustanzi kimiċi li jsiru sensitizzaturi permezz ta' trasformazzjoni abijotika.

Proapteni: Sustanzi kimiċi li jeħtiġu attivazzjoni enzimatika biex jehilsu l-potenzjal ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda.

Rilevanza: Deskrizzjoni tar-relazzjoni tat-test għall-effett ta' interess u jekk huwiex sinifikanti u utli għal skop partikolari. Din tiddetermina kemm it-test għandu l-hila jkejjel jew ibassar b'mod korrett l-effett bijoloġiku ta' interess. Ir-rilevanza tinkorpora l-kunsiderazzjoni tal-akkuratezza (konkordanza) ta' test (16).

Affidabbiltà: Kejljiet ta' kemm test jista' jitwettaq b'mod riprodubbli fil-laboratorji u bejn il-laboratorji tul iż-żmien, meta jitwettaq billi jintuża l-istess protokoll. Din tiġi evalwata billi tkun ikkalkolata r-riprodubbiltà fl-istess u bejn il-laboratorji u r-ripetibbiltà fl-istess laboratorju (16).

Sessjoni: Sessjoni tikkonsisti f'sustanza kimika tat-test waħda jew aktar ittestjata flimkien ma' kontroll negattiv u ma' kontroll b'solvent/b'veikolu.

Sensittività: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi pożittivi/attivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (16).

SLO-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-IL8LA. Ara IL8LA għad-definizzjoni.

SLR-LA: Abbrevjazzjoni użata fir-rapport ta' validazzjoni u fil-pubblikazzjonijiet preċedenti rigward l-assaġġ IL-8 Luc biex tirreferi għall-GAPLA. Ara GAPLA għad-definizzjoni.

Kontroll b'solvent/veikolu: Kampjun mhux trattat li fih il-komponenti kollha ta' sistema tat-test hliet tas-sustanza kimika tat-test, iżda li jinkludi s-solvent/il-veikolu li jintuża. Jintuża biex jiġi stabbilit ir-rispons tal-linja bazi għall-kampjuni trattati bis-sustanza kimika tat-test dissolta jew dispersa stabbilment fl-istess solvent/veikolu. Meta jiġi ttestjat ma' kontroll b'medium konkorrenti, dan il-kampjun juri wkoll jekk is-solvent/il-veikolu jkollux interazzjoni mas-sistema tat-test.

Speċificità: Il-proporzjon tas-sustanzi kimiċi negattivi/inattivi kollha li huma klassifikati kif suppost mit-test. Hi kejl tal-preċiżjoni għal test li jipproduċi riżultati kategorici, u hi kunsiderazzjoni importanti fil-valutazzjoni tar-relevanza ta' test (16).

Sustanza: Elementi kimiċi u l-komposti tagħhom fl-istat naturali jew miksuba bi kwalunkwe proċess ta' manifattura tal-produzzjoni, inkluż kwalunkwe addittiv meħtieġ għall-preservazzjoni tal-istabbiltà tal-prodott u ta' kwalunkwe impurità li toriġina mill-proċess użat, iżda eskluż kwalunkwe solvent li jista' jkun separat mingħajr ma jaffetwa l-istabbiltà tas-sustanza jew ibiddel il-kompożizzjoni tagħha.

Tensjoattiv: Imsejjaħ ukoll aġent tensjoattiv, dan huwa sustanza, bħal detergent, li tista' tnaqqas it-tensjoni tas-superfiċje ta' likwidu u b'hekk tippermettilu jtella' r-ragħwa jew jippenetra solidi; hu magħruf ukoll bħala aġent li jxarrab. (TG437)

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

THP-G8: Linja ta' ċelloli indikatur IL-8 użata fl-assaġġ IL-8 Luc. Il-linja ta' ċelloli umana qisha makrofagu, THP-1, giet transfettata fil-ġeni tal-luċiferażi SLO u SLR taħt il-kontroll

tal-promoturi tal-IL-8 u tal-GAPDH, rispettivament.

Is-Sistema Globalment Armonizzata tal-Klassifikazzjoni u l-Ittikettar ta' Sustanzi Kimiċi tan-Nazzjonijiet Uniti (GHS tan-NU): Sistema li tipproponi l-klassifikazzjoni tas-sustanzi kimiċi (sustanzi u taħlitiet) skont it-tipi u l-livelli standardizzati ta' perikli fiżiċi, sanitarji u ambjentali, u tindirizza l-elementi ta' komunikazzjoni korrispondenti, bħal pittogrammi, kliem ta' twissija, dikjarazzjonijiet ta' periklu, dikjarazzjonijiet ta' prekawzjoni u skedi ta' *data* dwar is-sikurezza, biex jitwassal tagħrif dwar l-effetti avversi bil-ghan li n-nies ikunu protetti (inklużi min iħaddem, il-ħaddiema, it-trasportaturi, il-konsumaturi u min jintervjeni f'emergenza) u l-ambjent (21).

UVCB: sustanzi ta' kompożizzjoni varjabbli jew mhux magħrufa, prodotti jew materjali bijoloġiċi b'reazzjoni kumplessa.

Metodu ta' ttestjar validu: Test meqjus li għandu biżżejjed rilevanza u affidabbiltà għal skop speċifiku u li hu bbażat fuq prinċipji xjentifiċi sodi. Test qatt ma jkunx validu f'sens assolut, iżda biss b'rabta ma' skop definit.

Appendiċi 3.2

IL-PRINĊIPJU TAL-KEJL TAL-ATTIVITÀ TAL-LUĊIFERAŽI U D-DETERMINAZZJONI TAL-KOEFFIĊJENTI TA' TRAZMISSJONI TAL-FILTRU OTTIKU GHALL-SLO U GHALL-SLR

Sistema ta' Assaġġ b'Diversi Indikaturi -Tripluc- tista' tintuża b'luminometru tat-tip tal-mikropjastri b'sistema ta' detezzjoni b'diversi kuluri, li jista' jitqabbdilha filtru ottiku (eż. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Il-filtru ottiku użat fil-kejl hu filtru long jew short pass ta' 600–620 nm, jew filtru band pass ta' 600–700 nm.

Il-kejl ta' luċiferażijiet b'żewġ kuluri b'filtru ottiku.

Dan hu eżempju bl-użu ta' Phelios AB-2350 (ATTO). Dan il-luminometru hu mgħammar b'filtru long pass ta' 600 nm (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, Filtru 1) għall-qsim tal-luminexxenza tal-SLO ($\lambda_{\text{mass}} = 580 \text{ nm}$) u tal-SLR ($\lambda_{\text{mass}} = 630 \text{ nm}$).

Biex jiġu determinati l-koeffiċjenti ta' tarżmissjoni tal-LP ta' 600 nm, l-ewwel, bl-użu tal-enzimi tal-luċiferażi SLO u SLR purifikati, kejjel i) l-intensità tal-intensità tal-bijoluminexxenza tal-SLO u tal-SLR mingħajr filtru (F0), ii) l-intensità tal-bijoluminexxenza tal-SLO u tal-SLR li tghaddi minn LP ta' 600 nm (Filtru 1), u iii) ikkalkola l-koeffiċjenti ta' tarżmissjoni tal-LP ta' 600 nm għall-SLO u għall-SLR elenkati hawn taht.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	κO_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	κR_{R60}	The filter's transmission coefficient for the SLR

Meta l-intensità tal-SLO u tal-SLR fil-kampjun tat-test jiġu definiti bħala O u R, rispettivament, i) l-intensità tad-dawl mingħajr filtru (kollox ottiku) F0 u ii) l-intensità tad-dawl li jittrażmetti mil-LP ta' 600 nm (Filtru 1) F1 jiġu deskritti kif muri hawn taht.

$$F0=O+R$$

$$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

Dawn il-formuli jistgħu jiġu spjegat kif ġej:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Imbagħad bl-użu tal-fatturi ta' trażmittanza kkalkolati ($\kappa_{O_{R60}}$ u $\kappa_{R_{R60}}$) u l-F0 u l-F1 imkejla, tkun tista' tikkalkola l-valur O u R kif ġej:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa_{O_{R60}} & \kappa_{R_{R60}} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

II-materjali u l-metodi għad-determinazzjoni tal-fattur ta' trażmittanza

(1) Reagenti

Enzimi tal-luċiferażi purifikati individwali:

Enzima tal-SLO purifikata lijoofilizzata

Enzima tal-SLR purifikata lijoofilizzata

(li għax-xogħol ta' validazzjoni nkisbu mill-GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, il-Ġappun mal-linja ta' ċelloli THP-G8)

Reagent tal-assaġġ:

Reagent tal-assaġġ tal-Luċiferażi Tripluc® (pereżempju minn TOYOBO Cat#MRA-301)

Medium: għall-assaġġ tal-luċiferażi (30 ml, maħżuna f'2 – 8°C)

Reagent	Konċ.	Konċ. finali fil-medium	Ammont meħtieġ
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Thejjiġa tas-soluzzjoni tal-enzimi

Iddisolvi l-enzima tal-luċiferażi purifikata lijoofilizzata f'tubu billi żżid 200 µl ta' 10 ~ 100 mM Tris/HCl jew Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) supplimentat b'10 % (w/v) glicerol, iddividi s-soluzzjoni tal-enzima f'alikwoti ta' 10 µl f'tubi li jintremew ta' 1,5 ml u aħżinhom fi friżer f'-80°C. Is-soluzzjoni tal-enzima ffriżata tista' tintuża sa sitt xhur wara. Meta tintuża, żid 1 ml medium għall-assaġġ tal-luċiferażi (RPMI-1640 b'10 % FBS) f'kull tubu li jkun fih is-soluzzjonijiet tal-enzimi (soluzzjoni tal-enzimi dilwita) u żommhom fuq is-silġ biex tipprevjeni d-diżattivazzjoni.

(3) Kejl tal-bijoluminexxenza

Holl ir-reagent tal-assaġġ tal-Luċiferażi Tripluc® (Tripluc) u żommu f'temperatura ambejntali f'banjumarija jew f'temperatura tal-arja ambjentali. Ixgħel il-luminometru 30 min qabel ma tibda l-kejl biex tħalli l-fotomultiplikatur jistabbilizza. Ittrasferixxi 100 µl tas-soluzzjoni tal-enzima dilwita fi pjastra sewda b'96 bwejra (qiegħ ċatt) (il-

kampjun ta' riferiment tal-SLO għal #B1, #B2, #B3, il-kampjun ta' riferiment tal-SLR għal #D1, #D2, #D3). Imbagħad ittrasferixxi 100 µl ta' Tripluc imsaħħan minn qabel f'kull bwejra tal-pjastra li jkun fiha s-soluzzjoni tal-enzima dilwita bl-użu ta' pipetman. Hawwad il-pjastra għal 10 min f'temperatura ambjentali (madwar 25°C) billi tuża xejker tal-pjastri. Nehhi l-bżiežaq mis-soluzzjonijiet fil-bwejriet jekk jitilgħu. Qiegħed il-pjastra fil-luminometru biex tkejjel l-attività tal-luċiferażi. Il-bijoluminexxenza titkejjel għal 3 sek kull waħda fin-nuqqas (F0) u fil-preżenza (F1) tal-filtru ottiku.

Il-koeffiċjent ta' trażmissjoni tal-filtru ottiku gie kkalkolat kif ġej:

Koeffiċjent ta' trażmissjoni (SLO ($\kappa_{O_{R60}}$))= (#B1 tal-F1+ #B2 tal-F1+ #B3 tal-F1) / (#B1 tal-F0+ #B2 tal-F0+ #B3 tal-F0)

Koeffiċjent ta' trażmissjoni (SLR ($\kappa_{R_{60}}$))= (#D1 tal-F1+ #D2 tal-F1+ #D3 tal-F1) / (#D1 tal-F0+ #D2 tal-F0+ #D3 tal-F0)

Il-fatturi kkalkolati tat-trażmittenza jintużaw għall-kejljiet kollha eżegwiti bl-użu tal-istess luminometru.

Kontroll tal-kwalità tat-tagħmir

Għandhom jintużaw il-proċeduri deskritti fil-protokoll IL-8 Luc (18).

Appendiċi 3.3

SUSTANZI TA' PROFICJENZA

Qabel l-użu ta' rutina tat-test deskritt f'dan l-Appendiċi tal-metodu ta' ttestjar B.71, il-laboratorji għandhom juru profiċjenza teknika billi jiksbu t-tbassir mistenni tal-assaġġ IL-8 għall-10 sustanzi rakkomandati fit-Tabella 1 u billi jiksbu l-valuri li jaqgħu fi ħdan il-medda ta' referenza rispettiva għal tal-anqas 8 mill-10 sustanzi ta' profiċjenza (magħżula biex jirrappreżentaw il-medda ta' risponsi għall-perikli ta' sensitizzazzjoni tal-ġilda). Kriterji tal-għażla oħra kienu li s-sustanzi jkunu disponibbli kummerċjalment, u li jkun hemm disponibbli *data* ta' riferiment *in vivo* ta' kwalità għolja kif ukoll *data in vitro* ta' kwalità għolja bl-assaġġ IL-8 Luc. Barra minn hekk, hemm *data* ta' riferiment ippubblikata disponibbli għall-assaġġ IL-8 Luc (6) (1).

Tabella 1: Sustanzi rakkomandati biex tintwera profiċjenza teknika bl-assaġġ IL-8 Luc

Sustanzi ta' profiċjenza	Numru tas-CAS	Stat	Solubbiltà f' X-VIVO15 f'20 mg/ml	Tbassir <i>in vivo</i> ¹	Tbassir tal-IL-8 Luc ²	Medda ta' riferiment (µg/ml) ³	
						CV05 ⁴	IL-8 Luc MIT ⁵
2,4-Dinitroklorobenzen	97-00-7	Solidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Estrem)	Pożittiv	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldeid	50-00-0	Likwidu	Solubbli	Sensitizzatur (B'sahhtu)	Pożittiv	9-30	4-9
2-Merkaptobenżotjazol	149-30-4	Solidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Moderat)	Pożittiv	250-290	60-250
Etilendiammina	107-15-3	Likwidu	Solubbli	Sensitizzatur (Moderat)	Pożittiv	500-700	0,1-0,4
Dimetakilat tal-Etileneglikol	97-90-5	Likwidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Dgħajjef)	Pożittiv	>2000	0,04-0,1
4-Allilanol (Estragol)	140-67-0	Likwidu	Insolubbli	Sensitizzatur (Dgħajjef)	Pożittiv	>2000	0,01-0,07
Sulfat tal-istreptomicina	3810-74-0	Solidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000
Glicerol	56-81-5	Likwidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000
Isopropanol	67-63-0	Likwidu	Solubbli	Mhux sensitizzatur	Negattiv	>2000	>2000

Abbrevjazzjonijiet: Nru tas-CAS = Numru tar-Registru tas-Servizz tat-Taqsiriet tas-Sustanzi Kimiċi

¹ Il-potenza *in vivo* tinkiseb bl-użu tal-kriterji proposti mill-ECETOC (19).

² Fuq il-bażi tal-valuri storiċi osservati (1) (6).

³ CV05 u IL-8 Luc MIT ġew ikkalkolati bl-uż tas-solubbiltà fl-ilma mogħtija minn EPI Suite™.

⁴ CV05: il-konċentrazzjoni minima li fiha s-sustanzi kimiċi juru anqas minn 0,05 tal-Inh-GAPLA.

⁵ MIT: l-anqas konċentrazzjonijiet li fihom sustanza kimika tissodisfa l-kriterji pożittivi.

Appendiċi 3.4

INDIĊIJET U KRITERJI TA' ĠUDIZZJU

nIL8LA (nSLO-LA)

Ir-ripetizzjoni nru j ($j = 1-4$) tal-konċentrazzjoni nru i ($i = 0-11$) titkejjel għall-IL8LA (SLO-LA) u għall-GAPLA (SLR-LA) rispettivament. L-IL8LA normalizzata, imsejha nIL8LA (nSLO-LA), u hi definita bħala:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Din hi l-unità bażika tal-kejl f' dan l-assaġġ.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Iż-żieda ta' drabi tal-nIL8LA medja (nSLO-LA) għar-ripetizzjoni tal-konċentrazzjoni nru i mqabbla magħha fil-konċentrazzjoni 0, Ind-IL8LA, hi l-kejl primarju ta' dan l-assaġġ. Dan il-proporzjon hu miktub bil-formula li ġejja:

$$\text{Ind} - IL8LA_i = \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\} / \{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\}$$

Il-laboratorju prinċipali ppropona li valur ta' 1,4 jikkorrispondi għal riżultat pożittiv għas-sustanza kimika ttestjata. Dan il-valur hu bbażat fuq l-investigazzjoni tad-*data* storika tal-laboratorju prinċipali. It-tim ta' ġestjoni tad-*data* mbagħad uża dan il-valur fil-fażijiet kollha tal-istudju ta' validazzjoni. L-eżitu primarju, Ind-IL8LA, hu l-proporzjon ta' żewġ medji aritmetiċi kif murija fl-ekwazzjoni.

Intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (CI ta' 95 %)

L-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % (CI ta' 95 %) fuq il-bażi tal-proporzjon jista' jiġi stmat li juri l-preċiżjoni ta' dan il-kejl tal-eżitu primarju. Il-limitu inferjuri tas-CI ta' 95 % ≥ 1 jindika li l-nIL8LA bil-konċentrazzjoni nru i hi ferm akbar minn dik bil-kontroll b'solvent. Hemm diversi modi biex jinbena s-CI ta' 95 %. Aħna użajna l-metodu magħruf bħala t-teorema ta' Fieller f' dan l-istudju. Din it-teorima tal-intervall ta' kunfidenza ta' 95 % tinkiseb mill-formula li ġejja:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

Fejn

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j n_{IL8LA_{0j}}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{0j}} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (n_{IL8LA_{ij}} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$ hi l-perċentil ta' 97,5 tad-distribuzzjoni ċentrali t bil- $\sqrt{v}$ tal-grad ta' libertà, fejn

$$v = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

L-Inh-GAPLA hi l-proporzjon tal-GAPLA medja (SLR-LA) għar-ripetizzjoni tal-konċentrazzjoni nru i meta mqabbla ma' dik bil-kontroll b'solvent, u din tinkiteb permezz ta'

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

Peress li l-GAPLA hi d-denominatur tal-nIL8LA, valur estremament żgħir jikkawża varjazzjoni kbira fl-nIL8LA. Għaldaqstant, valuri tal-Ind-IL8LA b'valur estremament żgħir tal-Inh-GAPLA (anqas minn 0,05) jistgħu jitqiesu li għandhom preċiżjoni baxxa.

Appendiċi 3.5

L-ISKEMA TAL-METODI BIEX JIĠU DISSOLTI SUSTANZI KIMIĊI GHALL-ASSAĠĠ IL-8 LUC.

- (a) Għal sustanzi kimiċi dissolti f'X-VIVO™ 15 f'20 mg/ml

VIVOTM 15 (l-1el sessjoni)



Fattur ta' dilwizzjoni ta' 5

Soluzzjoni ewlenija (4

Fattur ta' dilwizzjoni ta' 2

20 mg/ml

1 mg/ml

2 mg/ml

ng/ml

0

Žid mas-suspensjoni tač-čelloli fi pjastra b'96 bwejra

0,5 mg/ml

1 mg/ml

ng/ml

0

Iddetermina l-ogħla konċentrazzjoni tal-esperimenti li għejjin



CV05; l-anqas konċentrazzjoni li fiha Inh-GAPLA ssir
<0,05 (il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija
x1/fattur ta' dilwizzjoni (X))

Koncentrazioni finali fit-2ni, fit-3et u fir-4a esperiment

1 mg/ml 4 mg/ml

0

0.5 mg/ml 2 mg/ml

2ni, 3et, 4a sessjonijet



idditwixxi

1x

4x CV05 (4x il-konċentrazzjoni tas-soluzzjoni ewlenija x 1/X)

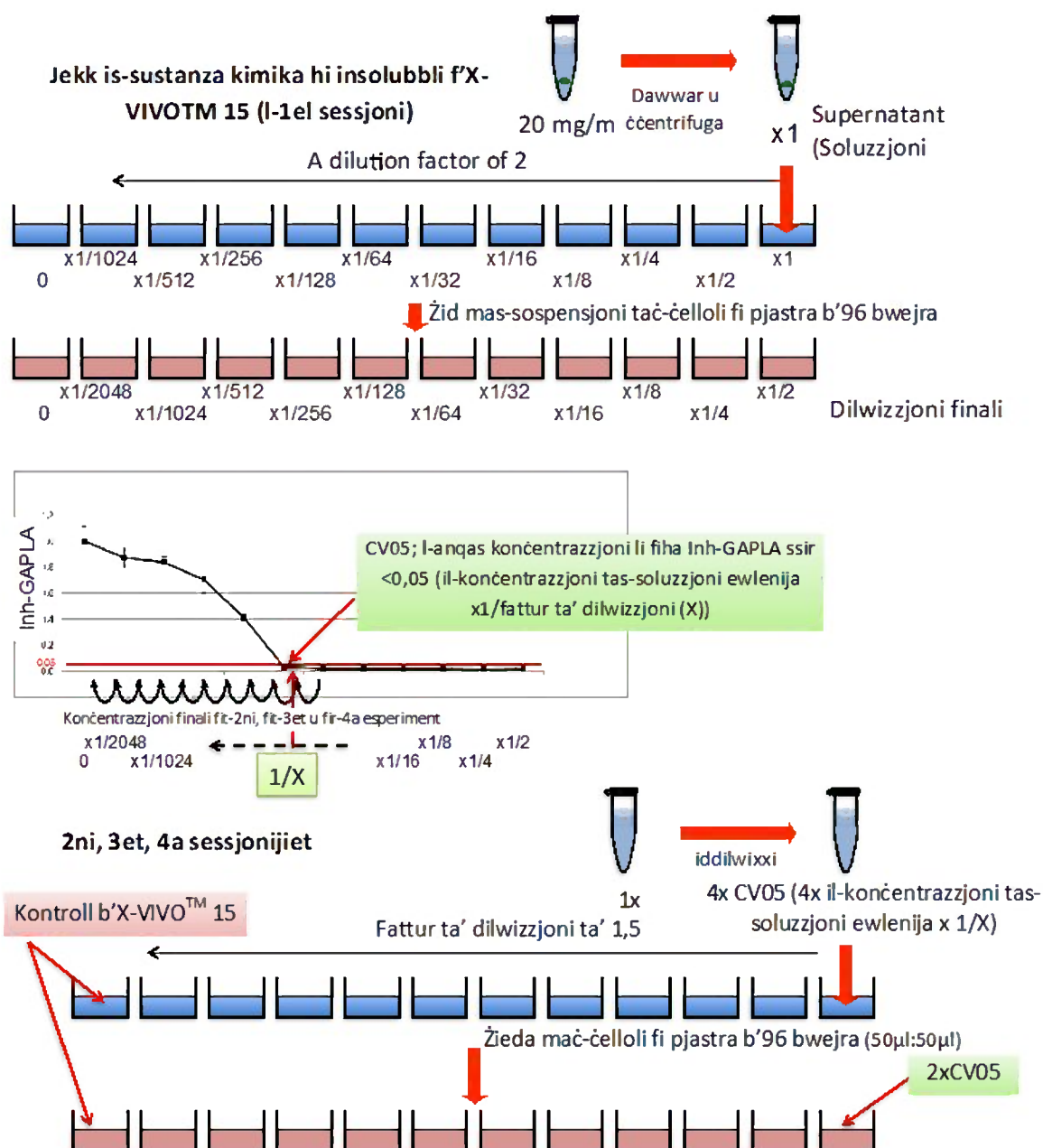
Fattur ta' dilwizzjoni ta' 1,5

Kontroll b'X-VIVO™ 15

Žieda mač-čelloli fi pjastra b'96 bwejra (50μl:50μl)

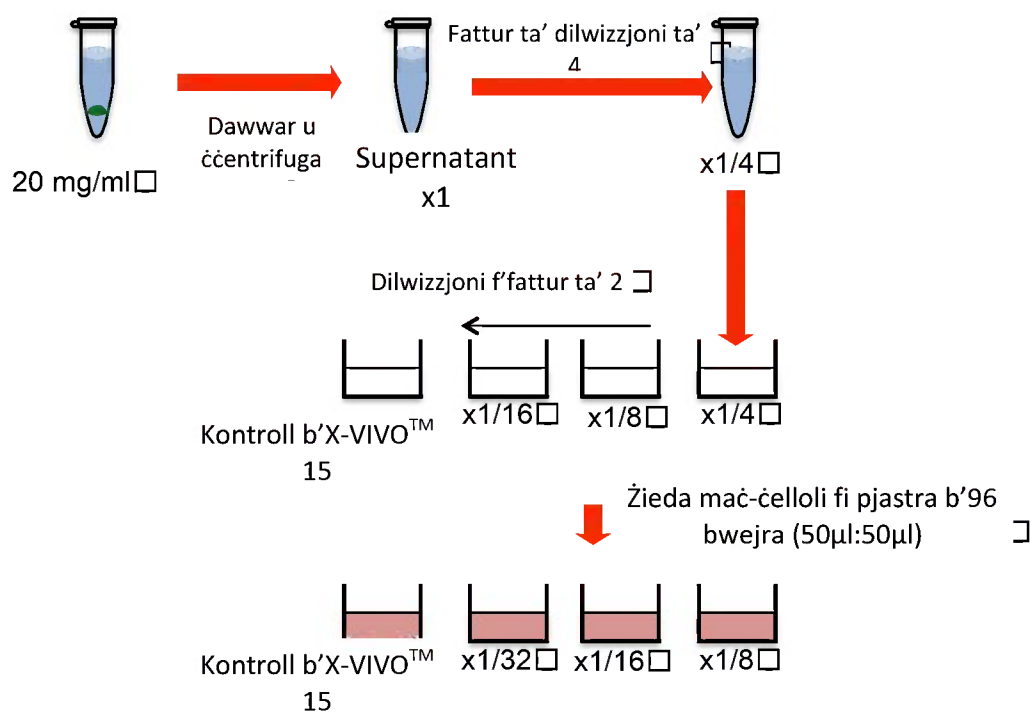
2xCV05

(b) Għal sustanzi kimiċi insolubbli f'X-VIVOTM 15 f'20 mg/ml



Appendiċi 3.6**L-ISKEMA TAL-METODU BIEX JIĠI DISSOLT 4-NBB GHALL-KONTROLL POŻITTIV TAL-ASSAĠĠ IL-8 LUC.**

Il-kontroll poŻittiv: 4-NBB (insolubbli f'X-VIVO™ 15



”

(9) Fil-Parti C, jizdiedu l-Kapitoli li ġejjin:

“C.52 TEST TAR-RIPRODUZZJONI TA’ ĠENERAZZJONI ESTIŻA WAHDA TA’ MEDAKA (MEOGRT)

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta’ ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test (TG) 240 tal-OECD (2015). It-Test ta’ Ġenerazzjoni Estiża Wahda ta’ Medaka (MEOGRT) jiddeskrivi metodu ta’ ttestjar komprensiv ibbażat fuq ħut espost fuq diversi ġenerazzjonijiet biex jagħti *data* rilevanti għall-valutazzjoni tal-periklu u tar-riskju ekoloġiċi tas-sustanzi kimiċi, inklużi sustanzi kimiċi interferenti endokrinali suspettati (EDCs). L-esponent fil-MEOGRT jibqa’ sat-tifqis (sa ġimagħtejn wara l-fertilizzazzjoni, wpf) fit-tieni ġenerazzjoni (F2). Ikunu meħtieġa investigazzjonijiet addizzjonali biex tiġi ġustifikata l-utilità tal-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2 lil hinn mit-tifqis; għalissa m’hemmx biżżejjed informazzjoni biex jiġu pprovduti l-kundizzjonijiet jew il-kriterji rilevanti għall-ġustifikazzjoni tal-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2. Madankollu, dan il-metodu ta’ ttestjar jista’ jiġi aġġornat hekk kif jiġu kkunsidrati informazzjoni u *data* godda. Pereżempju, gwida dwar l-estensjoni tal-ġenerazzjoni F2 permezz tar-riproduzzjoni tista’ tkun potenzjalment siewja f’ċerti ċirkustanzi (eż. sustanzi kimiċi b’potenzjal għoli ta’ bijokonċentrazzjoni jew b’indikazzjonijiet ta’ effetti transġenerazzjonali f’unitajiet tassonomiċi oħra). Dan il-metodu ta’ ttestjar jista’ jintuża biex jiġu evalwati l-effetti kroniċi potenzjali tas-sustanzi kimiċi, inklużi sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali, fuq il-ħut. Il-metodu jixhet enfasi primarja fuq l-effetti rilevanti potenzjali fuq il-popolazzjoni (jiġifieri, impatti avversi fuq is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u r-riproduzzjoni) għall-kalkolu ta’ Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) jew Konċentrazzjoni ta’ Effett (Ec_x), għalkemm ta’ min jinnota li l-approċċi tal-EC_x rarament ikunu xierqa għal studji kbar ta’ dan it-tip fejn iż-żieda tan-numru ta’ konċentrazzjonijiet tat-test biex tkun tista’ tiġi determinata l-EC_x mixtieqa tista’ tkun imprattika, u dan jista’ jikkawża wkoll tħassib sinifikanti relatat mal-benessri tal-annimali minhabba n-numru kbir ta’ annimali użati. Għal sustanzi kimiċi li ma jeħtiġux valutazzjoni fuq “diversi ġenerazzjonijiet” jew sustanzi kimiċi li mhumx sustanzi kimiċi interferenti endokrinali potenzjali, metodi ta’ ttestjar oħra jaf ikunu aktar adattati (1). Il-medaka hi l-ispeċi xierqa għall-użu f’dan il-metodu ta’ ttestjar, fid-dawl taċ-ċiklu tal-ħajja qasir tagħha u tal-possibbiltà li jiġi determinat is-sess ġenetiku tagħha (2), li hu meqjus komponent kritiku f’dan il-metodu ta’ ttestjar. Il-metodi speċifiċi u l-punti ta’ tmiem osservazzjonali spjegati f’dan il-metodu huma applikabbli għall-medaka biss. Speċijiet oħra ta’ ħut żgħir (eż. żebra) jistgħu jkunu adattati għal protokoll tat-test simili.

2. Dan il-metodu ta' ttestjar ikejjel diversi punti ta' tmiem bijoloġiċi. Tingħata enfasi primarja lill-effetti avversi potenzjali fuq il-parametri rilevanti għall-popolazzjoni inklużi s-sopravivenza, l-iżvilupp gross, it-tkabbir u r-riproduzzjoni. It-tieni nett, biex tiġi pprovduta informazzjoni mekkanistika u tiġi pprovduta konnessjoni bejn ir-riżultati minn tipi oħra ta' studji fuq il-post u fil-laboratorju, fejn ikun hemm evidenza *a posteriori* li sustanza kimika jkollha attività potenzjali ta' interferenza endokrinali (eż. attività androġenika jew estroġenika f'testijiet u f'assaġġi oħra), informazzjoni siewja oħra tinkiseb bil-kejl tal-mRNA tal-*vitellogenina* (*vtg*) (jew il-proteina tal-*vitellogenina*, il-*VTG*), tal-karatteristiċi sesswali sekondarji (SSC) fenotipiċi relatati mas-sess ġenetiku, u bl-evalwazzjoni tal-istopatoloġija. Ta' min jinnota li jekk sustanza kimika tat-test jew il-metaboliti tagħha ma jkunux suspettati li jkunu EDCs, jaf ma jkunx hemm bżonn li jitkejlu dawn il-punti ta' tmiem sekondarji u jaf ikun aktar xieraq li jintużaw studji anqas intensivi fl-użu ta' riżorsi u ta' annimali (1). Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Minhabba n-numru limitat ta' sustanzi kimiċi ttestjati u ta' laboratorji involuti fil-validazzjoni ta' dan l-assaġġ kemxejn kumpless, hu antiċipat li la jkun hemm numru suffiċjenti ta' studji disponibbli biex jiġi żgurat l-impatt ta' dan id-disinn il-ġdid tal-istudju, il-metodu ta' ttestjar jiġi rieżaminat u, jekk ikun hemm bżonn, rivedut, fid-dawl tal-esperjenza miksuba. Id-*data* tista' tintuża fil-Livell 5 tal-Qafas Kuncettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali (3). Il-metodu ta' ttestjar jibda bl-esponiment ta' ħut adult (il-ġenerazzjoni F0) għas-sustanza kimika tat-test matul il-fażi ta' riproduzzjoni. L-esponiment ikompli matul l-iżvilupp u r-riproduzzjoni fl-F1 u t-tifqis fil-ġenerazzjoni F2; b'hekk, l-assaġġ jippermetti l-evalwazzjoni tal-perkorsi endokrinali strutturali kif ukoll attivazzjonali. Jista' jintuża approċċ tal-piż tal-evidenza meta jiġu interpretati l-punti ta' tmiem relatati mas-sistema endokrinali.
4. It-test għandu jinkludi numru adegwat ta' individwi biex tiġi żgurata saħħa suffiċjenti għall-evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem rilevanti għar-riproduzzjoni (ara l-Appendiċi 3) filwaqt li jiġi żgurat li n-numru ta' annimali użati jkun il-minimu meħtieġ għal raġunijiet ta' benessri tal-annimali. Fid-dawl tan-numri kbar ta' annimali tat-test użati, importanti li tiġi kkunsidrata bir-reqqa l-htieġa għat-test b'rabta mad-*data* eżistenti li diġà jaf ikun fiha informazzjoni rilevanti fuq hafna mill-punti ta' tmiem fl-MEOGRT. Xi għajnuna f'dan ir-rigward tista' tinkiseb mill-Qafas tal-OECD għall-Ittestjar tat-Tossicità tal-Ħut (1).
5. Il-metodu ta' ttestjar tfassal primarjament biex jiddistingwi l-effetti ta' sustanza waħda. Madankollu, jekk ikun hemm bżonn li jsir test fuq taħlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk dan hux se jipprovdri riżultati aċċettabbli għall-fini regolatorju mahsub.

6. Qabel ma jinbeda t-test, importanti li wiehed ikollu informazzjoni dwar il-proprietajiet fizikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, b'mod partikolari biex ikunu jistgħu jiġu prodotti soluzzjonijiet kimiċi stabbli. Hu neċessarju wkoll li jkun hemm metodu analitiku sensitiv b'mod adegwat għall-verifika tal-koncentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test.

PRINĊIPJU TAT-TEST

7. It-test jinbeda bl-esponiment ta' rġiel u ta' nisa sesswalment maturi (tal-anqas 12-il wpf) f'pari tat-tgħammir għal tliet ġimgħat, li matulhom is-sustanza kimika tat-test titqassam fl-organizmu tal-ġenerazzjoni tal-ġenituri (F0) skont l-imġiba tossikokinetika tagħha. L-aktar qrib possibbli tal-ewwel jum tar-raba' ġimgħa, il-bajd jingabar biex tinbeda l-ġenerazzjoni F1. Matul it-trobbija tal-ġenerazzjoni F1 (15-il ġimgħa b'kollox), jiġu vvalutati l-kapaċità ta' tifqis u s-sopravivenza. Barra minn hekk, jittiehed kampjun tal-ħut wara 9-10 wpf għall-punti ta' tmiem tal-iżvilupp u r-riproduzzjoni tiġi vvalutata għal tliet ġimgħat mit-12 sal-14-il wpf. Ġenerazzjoni F2 tinbeda wara t-tielet ġimgħa tal-valutazzjoni tar-riproduzzjoni u titrabba sat-tlestija tat-tifqis.

KRITERJI TA' VALIDITÀ TAT-TEST

8. Japplikaw il-kriterji li ġejjin għall-validità tat-test:
- Il-koncentrazzjoni tal-ossigenu dissolt għandha tkun ≥ 60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;
 - It-temperatura medja tal-ilma tul id-durata shiħa tal-istudju għandha tkun ta' bejn 24 u 26°C. Hargiet qosra mill-medja skont l-akkwarji individwali ma għandhomx ikunu aktar minn 2°C;
 - Il-fekondità medja tal-kontrolli f'kull waħda mill-ġenerazzjonijiet (F0 u F1) għandha tkun akbar minn 20 bajda għal kull par kull jum. Il-fertilità tal-bajd kollu prodott matul il-valutazzjoni għandha tkun akbar minn 80 %. Barra minn hekk, 16 mill-24 par tat-tnissil tal-kontroll rakkomandati (> 65 %) għandhom jipproduċu aktar minn 20 bajda għal kull par kull jum;
 - Il-kapaċità ta' tifqis tal-bajd għandha tkun ≥ 80 % (medja) fil-kontrolli (f'kull waħda mill-ġenerazzjonijiet F1 u F2);
 - Is-sopravivenza wara t-tifqis sa 3 wpf u minn 3 wpf sat-terminazzjoni għall-ġenerazzjoni F1 (jiġifieri 15-il wpf) għandha tkun ≥ 80 % (medja) u ≥ 90 % (medja), rispettivament fil-kontrolli (F1);

- Għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi hdan $\pm 20\%$ tal-valuri medji mkejla.

Rigward it-temperatura tal-ilma, filwaqt li din mhix kriterju tal-validità, repliki fi hdan trattament ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin, u l-gruppi ta' trattament fi hdan test ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin (fuq il-bażi tal-kejljiet tat-temperatura ta' kuljum, u esklużi ħarġiet qosra).

9. Ghalkemm tista' tiġi osservata riproduzzjoni mnaqqsa fil-gruppi ta' esponiment oġġla, għandu jkun hemm riproduzzjoni suffiċjenti tal-anqas fit-tielet l-oġġla grupp u fil-gruppi inferjuri kollha ta' F0 biex jimtlew l-inkubaturi tat-tifqis. Barra minn hekk, għandu jkun hemm sopravivenza embrijonka adegwata fit-tliet gruppi bl-oġġla u bl-anqas esponiment fl-F1 biex tkun tista' ssir evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem fil-kampjunar subadult (ara l-paragrafi 36 u 38 u l-Appendiċi 9). Barra minn hekk, tal-anqas għandu jkun hemm sopravivenza minima wara t-tifqis ($\sim 20\%$) fit-tieni l-oġġla grupp ta' esponiment tal-F1. Dawn mhumix kriterji ta' validità per se, iżda rakkomandazzjonijiet biex ikunu jistgħu jiġu kkalkolati NOECs robusti.
10. Jekk tiġi osservata devjazzjoni mill-kriterji ta' validità tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tar-riżultati tat-test u dawn id-devjazzjonijiet u l-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inkluzi fir-rapport tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODU

Apparat

11. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:

- (a) ossiġenu u apparati li jkejlu l-pH;
- (b) tagħmir għad-determinazzjoni tal-ebusija u tal-alkalinità tal-ilma;
- (c) apparat adegwat għall-kontroll tat-temperatura u preferibbilment monitoraġġ kontinwu;
- (d) tankijiet magħmula minn materjal kimiku inerti u b'kapaċità adattata b'rabta mad-densità rakkomandata tat-tagħbija u tal-istokkjar (ara l-Appendiċi 3);
- (e) bilanċ preċiż biżżejjed (jiġifieri preċiż sa $\pm 0,5$ mg).

L-ilma

12. Kwalunkwe ilma li fih l-ispeċi tat-test juru sopravivenza u tkabbir adegwat fit-tul jista' jintuża bħala ilma tat-test. Għandu jkun ta' kwalità kostanti matul il-perjodu tat-test. Biex jiġi żgurat li l-lima tad-dilwizzjoni ma jkollux influwenza żejda fuq ir-riżultat tat-test

(pereżempju b'kumplessazzjoni tas-sustanza kimika tat-test) jew ma jaffettwax b'mod avvers il-prestazzjoni tal-istokk riproduttiv, għandhom jittiehdu kampjuni f'intervalli għall-analiżi. Għandu jsir il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), il-pestiċidi, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi, pereżempju, kull sitt xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li jkun relattivament kostanti fil-kwalità. Ċerti karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f' medda ta' $\pm 0,5$ unitajiet tal-pH.

Sistema ta' esponiment

13. Id-disinn u l-materjali użati għas-sistema ta' esponiment mhumieq speċifikati. Hgieg, azzar inossidabbli, jew materjal kimikament inerti ieħor għandu jintuża għall-bini tas-sistema tat-test li ma tkunx giet kontaminata matul it-testijiet preċedenti. Għall-fini ta' dan it-test, sistema ta' esponiment xierqa tista' tkun tikkonsisti f'sistema bi fluss kontinwu (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13).

Is-soluzzjonijiet tat-test

14. Is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandha titwassal fis-sistema ta' esponiment b'pompa xierqa. Ir-rata ta' fluss tas-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi kalibrata skont konferma analitika tas-soluzzjonijiet tat-test qabel it-tneċċja tal-esponiment, u tiġi verifikata volumetrikament kull ċertu żmien matul it-test. Is-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġgedded b'mod adegwat (eż. il-volum jiġgedded għal hames darbiet kuljum sa 16-il tiġdid kuljum jew fluss sa 20 ml/min) skont l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test u l-kwalità tal-ilma.
15. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jithejjew billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija preferibbilment għandha tithejja billi sempliċement tithallat jew tithawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. bit-thawwid jew bl-ultrasonikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni/sistemi ta' saturazzjoni jew metodi ta' dożaġġ passiv (14) biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Għandu jittiehed kull sforz biex jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: (1) ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossicità u/jew f'risponsi mhux mixtieqa jew mhux mistennija, (2) l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi f'livell oġhla mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom (hekk kif spiss jista' jseħh bl-użu tas-solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet imprecizi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, (3) l-użu ta' solventi f'testijiet aktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad sinifikanti ta' "biofilming" assoċjata ma' attività mikrobika li tista' thalli impatt fuq il-kundizzjonijiet ambejntali kif ukoll fuq il-hila li jinżammu l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment u (4) fl-assenza ta' data storika li turi li s-solvent ma jinfluwenzax l-eżitu tal-istudju, l-użu ta' solventi jehtieg trattament ta' kontroll b'solvent li għandu implikazzjonijiet fuq il-benessri tal-annimali peress li jkunu

meħtieġa annimali addizzjonali biex isir it-test. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, solvent jista' jintuża bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida 23 tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akkwatika ta' Sustanzi u ta' Tahlitiet Diffiċli (15) biex jiġi determinat l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent se tiġi determinata mill-proprietajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test u mid-disponibbiltà ta' data storika dwar l-użu tas-solvent. Jekk jintużaw trasportaturi tas-solvent, għandhom jiġu evalwati kontrolli b'solvent xierqa minbarra kontrolli (negattivi) mhux b'solvent (ilma ta' dilwizzjoni biss). F'każ li l-użu ta' solvent ma jkunx evitabbli, u sseħħ attività mikrobika (biofilming), hu rakkomandat li jinżamm rekord/li jiġi rapportat dwar il-biofilming għal kull tank (tal-anqas kull ġimgħa) matul it-test shiħ. Idealment, il-konċentrazzjoni tas-solvent għandha tinżamm kostanti fil-kontroll b'solvent u fit-trattamenti kollha tat-test. Jekk il-konċentrazzjoni tas-solvent ma tinżammx kostanti, għandha tintuża l-ogħla konċentrazzjoni tas-solvent fit-trattament tat-test fil-kontroll b'solvent. F'każijiet li fihom jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet massimi tas-solvent ma għandhomx jaqbżu 1-100 µl/l jew 100 mg/l (15), u hu rakkomandat li l-konċentrazzjoni b'solvent tinżamm għall-anqas livell possibbli (eż. < 20 µl/l) biex jiġi evitat effett potenzjali tas-solvent fuq il-punti ta' tmiem imkejla (16).

L-annimali tat-test

Għażla u żamma tal-ħut

16. L-ispeċi tat-test hi l-medaka *Oryzias latipes* minhabba ċ-ċiklu tal-ħajja qasir tagħha u l-possibbiltà li jiġi determinat is-sess ġenetiku. Għalkemm speċijiet oħra ta' ħut żgħir jistgħu jkunu adattati għal protokoll tat-test simili, il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodi ta' ttestjar huma applikabbli għall-medaka biss (ara l-paragrafu 1). Il-medaka tiġi indotta minnufih biex titnissel f'kaptività; jeżistu metodi ppubblikati għall-koltura tagħha (17) (18) (19), u hemm data disponibbli minn testijiet tal-letalità fuq terminu qasir tal-istadju bikri tal-ħajja u taċ-ċiklu shiħ tal-ħajja (5) (6) (8) (9) (20). Il-ħut kollu jinżamm fuq fotoperjodu ta' 16-il siegħa dawl:8 sigħat dlam. Il-ħut jintema' gambli ħaj tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., li jistgħu jiġu supplimentati b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn. L-ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli għandu jiġi analizzat b'mod regolari għall-kontaminanti.
17. Dment li jiġu segwiti Prattiki xierqa tat-trobbija, ma jkun meħtieġ ebda protokoll speċifiku tal-koltura. Pereżempju, il-medaka tista' titrabba f'tankijiet taż-2 l b'240 ħuta larva f'kull tank sar-4 wpf, u mbagħad jistgħu jitrabbew f'tankijiet taż-2 l b'10 ħutiet f'kull tank sat-8 wpf, meta dawn jiġu trasferiti f'tankijiet taż-2 l f'pari tat-tgħammir.

Akklimazzjoni u għażla tal-ħut

18. Il-ħut tat-test għandu jintgħażel minn stokk wiehed tal-laboratorju li jkun thalla jderri għal tal-anqas ġimagħtejn qabel it-test fil-kondizzjonijiet ta' kwalità tal-ilma u ta' illuminazzjoni li jkunu simili għal dawk użati fit-test (Nota: Dan il-perjodu ta' akklimazzjoni mhuwiex perjodu ta' qabel l-esponiment *in situ*). Hu rakkomandat li l-ħut tat-test jinkiseb minn koltura interna, peress li t-trasport ta' ħut adult hu stressanti u jista' jtellief ir-riproduzzjoni affidabbli. Il-ħut għandu jintema' nauplii tal-gambli tal-ilma mielaħ darbtejn kuljum matul il-perjodu ta' żamma kollu u matul il-faži ta' esponiment kollha, supplimentat b'ikel fil-forma ta' laqx disponibbli kummerċjalment jekk ikun hemm bżonn. Tal-anqas 42 par tat-tgħammir (54 par tat-tgħammir jekk ikun meħtieġ kontroll b'solvent minħabba, parzjalment, nuqqas ta' *data* storika li ssostni l-użu tal-kontroll b'solvent biss) huma meqjusa neċessarja biex jinbeda dan it-test bl-għan li tiġi żgurata replika adegwata. Barra minn hekk, kull par tat-tgħammir ta' F0 għandu jiġi verifikat li jkun XX-XY (jiġifieri komplement normali ta' kromozomi as-sess f'kull sess) biex tiġi evitata l-inkluzjoni possibbli ta' rġiel XX spontanji (ara l-paragrafu 39).
19. Minħabba l-faži ta' akklimazzjoni, il-mortalitajiet fil-ħut tal-koltura għandhom jiġu registrati u għandhom jiġu applikati l-kriterji li ġejjin wara perjodu ta' ssetiljar ta' 48 siegħa:
- Mortalijiet akbar minn 10 % tal-popolazzjoni tal-koltura f'sebat ijiem qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: irrifjuta l-lott shiħ;
 - Mortalijiet ta' bejn 5 % u 10 % tal-popolazzjoni fis-sabat ijiem ta' qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: akklimazzjoni għal sebat ijiem addizzjonali għall-perjodu ta' akklimazzjoni ta' ġimagħtejn (2); jekk ikun hemm mortalità akbar minn 5 % matul it-tieni sebat ijiem, irrifjuta l-lott kollu;
 - Mortalijiet ta' anqas minn 5 % tal-popolazzjoni fis-sabat ijiem ta' qabel it-trasferiment fis-sistema tat-test: aċċetta l-lott.
20. Il-ħut ma għandux jirċievi trattament għal mard fil-perjodu ta' akklimazzjoni ta' ġimagħtejn qabel it-test u matul il-perjodu ta' esponiment, u t-trattament tal-mard għandu jiġi evitat għalkollox jekk dan ikun possibbli. Ħut b'sinjali kliniċi ta' mard ma għandux jintuża fl-istudju. Għandu jinżamm rekord ta' osservazzjonijiet u ta' kwalunkwe trattament profilattiku u terapewtiku tal-mard matul il-perjodu tal-koltura ta' qabel it-test.
21. Il-faži ta' esponiment għandha tinbeda b'ħut adult sesswalment dimorfiku u mqassam skont is-sess ġenetiku minn provvista mil-laboratorju ta' annimali maturi riproduttivament kolturati f' 25 ± 2 °C. Il-ħut għandu jiġi identifikat bħala nissiel ipprovat (jiġifieri jkun iproduċa wlied vijabbli) matul il-ġimgħa ta' qabel l-esponiment. Għall-grupp kollu ta' ħut użat fit-test, il-medda tal-piżijiet individwali skont is-sess fil-bidu tat-test għandha tinżamm fi ± 20 % tal-piż medju aritmetiku tal-istess sess. Subkampjun tal-ħut

għandu jintiżen qabel it-test biex jiġi stmat il-piż medju. Il-ħut magħżul għandu jkollu tal-anqas 12-il wpf, ikun jiżen ≥ 300 mg għan-nisa u ≥ 250 mg għall-irġiel.

DISINN TAT-TEST

Konċentrazzjonijiet tat-test

22. Hu rakkomandat li jintużaw hames konċentrazzjonijiet ta' sustanzi kimiċi flimkien mal-kontroll(i). Is-sorsi kollha ta' informazzjoni għandhom jiġu kkunsidrati meta tingħażel il-medda tal-konċentrazzjonijiet tat-test, inklużi r-relazzjonijiet kwantitattivi bejn l-istruttura u l-attività (QSARs), ir-read-across minn analogi, ir-riżultati tat-testijiet fuq il-ħut bħal assaġġi tal-mortalità akuta (il-Kapitolu C.1 ta' dan l-Anness), l-assaġġ dwar ir-riproduzzjoni fuq terminu qasir tal-ħut (il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness) u metodi ta' ttestjar oħra, eż. il-Kapitoli C.15, C.37, C.41, C.47 jew C.49 ta' dan l-Anness (21) (22) (23) (24) (25) (26) jekk disponibbli, jew jekk ikun hemm bżonn, minn test ta' sejbien tal-medda, possibilment inkluża fażi ta' riproduzzjoni. Jekk ikun hemm bżonn, it-test ta' sejbien tal-medda jista' jsir f'kundizzjonijiet (kwalità tal-ilma, sistema tat-test, tgħabbija tal-annimali) simili għal daww użati għat-test definittiv. Jekk l-użu ta' solvent ikun neċessarju u ma jkun hemm ebda *data* storika disponibbli, it-test ta' sejbien tal-medda jista' jintuża biex jidentifika x-xerqien tas-solvent. L-ogħla konċentrazzjoni tat-test ma għandhiex taqbeż is-solubilità fl-ilma, 10 mg/l jew 10 % tas-96h-LC50 (27). L-anqas konċentrazzjoni għandha tkun fattur ta' 10 sa 100 darba anqas mill-ogħla konċentrazzjoni. L-użu ta' hames konċentrazzjonijiet f'dan it-test jippermetti mhux biss li jitkejlu r-relazzjonijiet bejn id-doża u r-rispons, iżda jipprovdwi wkoll il-Konċentrazzjoni bl-Inqas Effett Osservat (LOEC) u l-NOEC li huma neċessarji għall-valutazzjoni tar-riskju f'ċerti programmi regolatorji jew ġurisdizzjonijiet. Ġeneralment, il-fattur ta' spazjar bejn il-konċentrazzjonijiet nominali tas-sustanza kimika tat-test bejn il-livelli ta' trattament adjaċenti jkun $\leq 3,2$.

Repliki fi hdan gruppi ta' trattament u kontrolli

23. Tal-anqas għandhom jintużaw sitt kompartimenti tat-test repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test (ara l-Appendiċi 7). Matul il-fażi riproduttiva (hlief il-ġenerazzjoni F0), l-istruttura tar-replika tirdoppja għall-valutazzjoni tal-fekondità u kull replika jkollha par tat-tniissil wieħed biss (ara l-paragrafu 42).
24. Minbarra l-konċentrazzjonijiet tat-test, għandhom isiru kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u, jekk meħtieġ, kontroll b'solvent. Għandu jintuża numru rdoppjat ta' kompartimenti repliki għall-kontrolli biex tiġi żgurata saħħa statistika adegwata (jiġifieri tal-anqas għandhom jintużaw $\text{tnax-il replika għall-kontrolli}$). Matul il-fażi riproduttiva, in-numru ta' repliki fil-kontrolli jirdoppja (jiġifieri 24 replika bħala minimu u kull replika jkollha par tat-tgħammir

wiehed biss). Wara r-riproduzzjoni, ir-repliki tal-kontroll ma ghanudx ikun fihom aktar minn 20 embrijun (ħut).

PROCEDURA

Tnedija tat-test

25. Il-ħut adult riproduttivament attiv użat biex tinbeda l-ġenerazzjoni F0 tat-test jintgħazel fuq il-baži ta' żewġ kriterji: l-età (tipikament aktar minn 12-il wpf iżda hu rakkomandat li ma jinqabzux is-16-il wpf) u l-piż (għandu jkun ≥ 300 mg għan-nisa u ≥ 250 mg għall-irġiel).
26. Il-pari mara-raġel li jissodisfaw l-ispeċifikazzjonijiet imsemmija hawn fuq jitmexxew bħala pari individwali f'kull replika tat-tank, jiġifieri tmax-il replika f'kontrolli u sitt repliki fi trattamenti kimiċi fil-bidu tat-test. Dawn it-tankijiet jiġu assenjati trattament b'mod aleatorju (eż. T1-T5 u kontroll) u replika (eż. A-L fil-kontrolli u A-F fit-trattament), u mbagħad jitqiegħdu fis-sistema ta' esponiment bil-fluss xieraq f'kull tank.

Il-kundizzjonijiet tal-esponiment

27. Sommarju sħiħ tal-parametri tat-test u tal-kundizzjonijiet jista' jinstab fl-Appendiċi 3. L-aderenza ma' dawn l-ispeċifikazzjonijiet għandha tirriżulta f'ħut tal-kontroll b'valuri tal-punt ta' tmiem simili għal daww elenkati fl-Appendiċi 4.
28. Matul it-test, l-ossigenu dissolt, il-pH u t-temperatura għandhom jitkejlu f'tal-anqas reċipjent wiehed tat-test ta' kull grupp tat-trattament u tal-kontroll. Tal-anqas, dawn il-kejljiet, hliet it-temperatura, għandhom isiru darba fil-ġimgħa matul il-perjodu ta' esponiment kollu. It-temperatura medja tal-ilma matul id-durata sħiħa tal-istudju għandha tkun bejn 24 u 26°C matul it-test sħiħ. It-temperatura għandha titkejjel kuljum matul il-perjodu ta' esponiment. Il-pH tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 6,5 sa 8,5, iżda matul test speċifiku għandha tkun f'medda ta' $\pm 0,5$ unitajiet tal-pH. Repliki fi hdan trattament ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin, u l-gruppi ta' trattament fi hdan test ma għandhomx ikunu statistikament differenti minn xulxin (fuq il-baži tal-kejljiet tat-temperatura ta' kuljum, u esklużi ħargiet qosra).

Durata tal-esponiment

29. It-test jesponi ħut sesswalment riproduttiv mill-F0 għal tliet ġimgħat. Fil-ġimgħa 4, bejn wiehed u iehor fil-jum 24 tat-test, l-F1 tiġi stabbilita u l-pari tat-tgħammir F0 jinqatlu bl-ewtanażja u jittiehed rekord tal-piż u tat-tul (ara l-Paragrafu 34). Dan hu segwit minn esponiment tal-ġenerazzjoni F1 għal aktar minn 14-il ġimgħa oħra (total ta' 15-il ġimgħa għall-F1) u tal-ġenerazzjoni F2 għal ġimgħatejn sat-tifqis. Id-durata totali tat-test hi

primarjament ta' 19-il ġimgħa (jiġifieri sat-tifqis tal-F2). L-iskedi ta' żmien għat-test huma muriġa fit-Tabella 2 u spjegati aktar f'dettall fl-Appendiċi 9.

Reġim tal-ġhalf

30. Il-ħut jista' jitgħalef il-gambli tal-ilma mielaħ *Artemia* spp. (nauplii li jkollhom 24 siegħa) *ad libitum*, supplimentati b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn. L-ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli għandu jiġi analizzat b'mod regolari għal kontaminanti bħal pesticidi organokloriniċi, idrokarburi aromatiċi poliċikliċi (PAHs), poliklorobifenili (PCBs). Ikel b'livell elevat ta' sustanzi attivi endokrinalment (jiġifieri fitoestrogeni) li jistgħu jxekklu r-rispons tat-test għandhom jiġu evitati. Ikel mhux mikul u materjal tar-rawt għandhom jitneħħew mir-reċipjenti tat-test skont il-bżonn, eż. billi jitnaddaf il-qiegħ ta' kull tank permezz ta' sifun. Il-ġnub u l-qiegħ ta' kull tank għandhom jitnaddfu wkoll darba jew darbtejn fil-ġimgħa (eż. bil-brix bi spatula). Fl-Appendiċi 5 jingħata eżempju tal-iskeda tat-tagħlif. Ir-rata tat-tagħlif hi bbażata fuq in-numru ta' ħut għal kull replika. Għaldaqstant, ir-rata tat-tagħlif tonqos jekk ikun hemm il-mortalitajiet f'replika.

Determinazzjoni u kejljiet analitiċi

31. Qabel jibda l-perjodu ta' esponiment, għandu jiġi żgurat li s-sistema tat-twassil tas-sustanza kimika taħdem kif suppost. Għandhom jiġu stabbiliti l-metodi analitiċi meħtieġa kollha, inkluż għarfien suffiċjenti dwar l-istabbiltà tas-sustanza kimika fis-sistema tat-test. Matul it-test, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa, idealment tal-anqas kull ġimgħa f'replika waħda għal kull grupp tat-trattament, b'rotazzjoni bejn ir-repliki tal-istess grupp tat-trattament kull ġimgħa.
32. Matul it-test, ir-rati tal-fluss tad-dilwent u tas-soluzzjoni ewlenija għandhom jiġu verifikati f'intervalli kif xieraq (eż. tal-anqas tliet darbiet fil-ġimgħa). Hu rrakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammet b'mod sodisfaċenti fi $\pm 20\%$ tal-valuri medji mkejla, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla. F'każ ta' sustanzi kimiċi li jakkumulaw b'mod sinifikanti fil-ħut, il-konċentrazzjonijiet tat-test jistgħu jonqsu hekk kif jikber il-ħut. F'każijiet bħal dawn, hu rrakkomandat li r-rata ta' tiġdid tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment tiġi adattata biex il-konċentrazzjonijiet tat-test jinżammu l-aktar kostanti possibbli.

Osservazzjonijiet u punti ta' tmiem imkejla

33. Il-punti ta' tmiem imkejla jinkludu l-fekondità, il-fertilità, it-tifqis, it-tkabbir u s-sopravivenza għall-evalwazzjoni tal-effetti possibbli fil-livell tal-popolazzjoni. L-osservazzjonijiet tal-imġiba għandhom isiru ta' kuljum ukoll, u kwalunkwe mġiba mhux

tas-soltu għandha tiġi notata. Punti ta' tmiem mekkanistiċi oħra jinkludu l-livelli tal-proteini epatiċi tal-mRNA *vtg* jew tal-VTG b'immunoassagg (28), markaturi fenotipici sesswali bħall-papilli karatteristiċi tal-papilli tal-pinen anali tal-irġel, evalwazzjoni istoloġika tas-sess gonadali, u evalwazzjoni istopatoloġika tal-kilwa, tal-fwied u tal-gonad (ara l-lista ta' punti ta' tmiem fit-Tabella 1). Dawn il-punti ta' tmiem speċifiċi kollha jiġu evalwati fil-kuntest ta' determinazzjoni tas-sess ġenetiku tal-individwu, fuq il-bażi tal-preżenza jew tal-assenza tad-*dmy* tal-ġene li jiddetermina s-sess masiki tal-medaka (ara l-paragrafu 41). Barra minn hekk jiġi evalwat il-ħin għar-riproduzzjoni wkoll. Barra minn hekk, il-proporzjonijiet sempliċi tas-sessi fenotipici jistgħu jinkisbu bl-użu tal-informazzjoni mill-għadd ta' papilli tal-pinen anali biex medaka individwali jiġu definiti bħala fenotipikament irġiel jew nisa. Dan il-metodu ta' ttestjar ma jkunx mistenni jindivdwa devjazzjonijiet modesti mill-proporzjon mistenni tas-sessi peress li n-numri relattivament żgħir ta' ħut għal kull replika mhux se jipprovdi biżżejjed saħħa statistika. Barra minn hekk, matul il-valutazzjoni istopatoloġika, il-gonad jiġi evalwat u jsiru analizijiet ferm aktar b'saħħithom għall-valutazzjoni tal-fenotip tal-gonad fil-kuntest tas-sess ġenetiku.

34. L-iskop primarju ta' dan il-metodu ta' ttestjar hu li jivvaluta l-effetti potenzjali rilevanti għall-popolazzjoni ta' sustanza kimika tat-test. Il-punti ta' tmiem mekkanistiċi (VTG, SSCs u ċerti effetti tal-istopatoloġija gonadali) jistgħu jassistu wkoll fid-determinazzjoni ta' jekk xi effett huwiex medjat b'xi attività endokrinali. Madankollu, dawn il-punti ta' tmiem mekkanistiċi jistgħu jkun influwenzati wkoll minn tossiċitajiet sistemiċi u oħrajn. Konsegwentement, l-istopatoloġija tal-fwied u tal-kliwi tista' tiġi vvalutata wkoll f'dettall biex jinftiehem aħjar kwalunkwe rispons f'punti ta' tmiem mekkanistiċi. Madankollu, jekk ma jsirux dawn l-evalwazzjonijiet dettaljati, anormalitajiet grossi osservati b'mod inċidentali matul l-evalwazzjoni istopatoloġika xorta waħda għandhom jiġu nnotati u rapportati.

Il-qtil bl-ewtanazja tal-ħut

35. Fit-terminazzjoni tal-esponiment tal-ġenerazzjoni F0 u F1 meta jittiehed kampjun tal-ħut subadult, il-ħut għandu jiġi ewtanizzat b'ammonti xierqa ta' soluzzjoni anestetika (eż. Trikaina metan sulfonat, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/l) baferjata bi 300 mg/l NaHCO₃ (bikarbonat tas-sodju, CAS.144-55-8) biex titnaqqas l-irritazzjoni tal-membrana mukuża. Jekk il-ħut ikun qed juri sinjali ta' tbatija konsiderevoli (serji ħafna u l-mewt tista' titbassar b'mod affidabbli) u jitqies moribund, l-animali għandhom jiġu anestezizzati u ewtanizzati u trattati bħala mortalità għall-analizi tad-*data*. Meta ħuta tiġi ewtanizzata minhabba morbidità, dan għandu jiġi notat u rapportat. Skont meta l-ħuta tiġi ewtanizzata matul l-istudju, il-ħuta tista' tinzamm għall-analizi tal-istopatoloġija (iffissar tal-ħuta għall-istopatoloġija possibbli).

Immaniġġjar tal-bajd u tal-hut larvali

Il-ġbir tal-bajd minn pari tat-tnissil biex tiġi propagata l-ġenerazzjoni li jmiss

36. Il-ġbir tal-bajd isir fl-ewwel jum (jew fl-ewwel jumejn, jekk ikun hemm bżonn) tal-Ġimġha 4 tat-Test għall-proċediment mill-F0 għall-F1 u tal-Ġimġha 18 tat-Test għall-proċediment mill-F1 għall-F2. Il-Ġimġha 18 tat-Test tikkorrispondi għal hut adult tal-F1 li jkollu 15-il wpf (ġimġhat wara l-fertilizzazzjoni). Importanti li l-bajd kollu jitneħħa minn kull tank jum qabel ma jibda l-ġbir tal-bajd biex jiġi żgurat li l-bajd kollu miġbur minn pari tat-tnissil ikun ġej minn riproduzzjoni waħda. Wara r-riproduzzjoni, il-medaka mara kultant iġġorr il-bajd tagħha qrib il-fetha sakemm il-bajd ikun jista' jiġi depożitat fuq substrat. B'ebda substrat preżenti fit-tank, il-bajd jista' jinstab jew imqabbad mal-mara jew fil-qieġ tat-tank. Skont il-post tiegħu, il-bajd jitneħħa bir-reqqa mill-mara jew jingibed b'sifun mill-qieġ fil-Ġimġha 4 tat-Test tal-F0 u fil-Ġimġha 18 tat-Test tal-F1. Il-bajd kollu miġbur fi hdan trattament jingabar flimkien qabel id-distribuzzjoni f'kompartimenti ta' inkubazzjoni.
37. Il-filamenti tal-bajd, li jzommu l-bajd riprodott flimkien, għandhom jitneħħew. Il-bajd fertilizzat (sa 20) jingabar minn kull pari tat-tnissil (par 1 għal kull replika), jingabar skont it-trattament, u jitqassam b'mod sistematiku f'kompartimenti xierqa ta' inkubazzjoni (Appendiċi 6, 7). Bl-użu ta' mikroskopju ta' kwalità tajba, wieħed ikun jsita' jara l-indikaturi ta' fertilizzazzjoni/żvilupp bikrin bħat-tluġ tal-membrana tal-fertilizzazzjoni (korjon), id-diviżjoni kurrenti taċ-ċelloli, jew il-formazzjoni tal-blastula. Il-kompartimenti tal-inkubaturi jistgħu jitqiegħdu f'"akkwarji inkubaturi" separati stabbiliti għal kull trattament (f'liema każ il-parametri tal-kwalità tal-ilma u l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test iridu jitkejlu fihom), jew fl-akkwarju replika li fih ikun hemm il-larva mfaqqsa (eż. elewteroembrijun). Jekk ikun hemm bżonn tat-tieni jum tal-ġbir (Jum 23 tat-Test), il-bajd kollu minn dawn iż-żewġ granet għandu jingabar flimkien u mbagħad jitqassam b'mod sistematiku f'kull waħda mir-repliki tat-trattament.

Trobbija tal-bajd għat-tifqis

38. Il-bajd fertilizzat jittheżzeż il-hin kollu eż., fi hdan l-inkubatur tal-bajd bi bżieġaq tal-arja jew bit-tbandil vertikali tal-inkubatur tal-bajd. Il-mortalitajiet tal-bajd fertilizzat (embrijuni) jiġu verifikati u reġistrati ta' kuljum. Bajd mejjet jitneħħa mill-inkubaturi (Appendiċi 9). Fil-jum 7 wara l-fertilizzazzjoni (dpf), it-theżziż jitwaqqaf jew jitnaqqas biex il-bajd fertilizzat ikun jista' joqġhod fil-qieġ tal-inkubatur. Dan jippromwovi t-tifqis, tipikament tul il-jum jew il-jumejn segwenti. Għal kull trattament u kontroll, l-imfaqqsa (larva żgħar; elewteroembrijun) jingħaddu (fuq il-bażi ta' repliki miġbura flimkien). Il-bajd fertilizzat li ma jkunx għadu faqqas sad-doppju tal-jum medjan tat-tifqis fil-kontroll (tipikament dpf 16 jew 18) jitqies mhux vijabbli u jintrema.

39. Tnax-il imfaqqas jiġu trasferiti f'kull tank replika. L-imfaqqas mill-kompartimenti ta' inkubazzjoni jingabru flimkien u jitqassmu b'mod sistematiku f'tankijiet replika (Appendiċi 7). Dan jista' jsir bl-għażla aleatorja ta' mfaqqas mill-grupp tat-trattament u biż-żieda sekwenzjali ta' mfaqqas fi grupp indiskriminat f'akwarju replika. Kull wieħed mit-tankijiet għandu jkun fih numru uguali ($n=12$) tal-larva mfaqqsa (massimu ta' 20 larva kull wieħed). Jekk ma jkunx hemm biżżejjed imfaqqas biex jimtlew ir-repliki kollha tat-trattament, hu rakkomandat li jiġi żgurat l-akbar ammont possibbli ta' repliki bi 12-il imfaqqas. L-imfaqqas jistgħu jiġu mmanigġjati b'mod sikur b'pipetti tal-ħgieg b'toqba wiesgħa. Kwalunkwe mfaqqas addizzjonali jinqatel bl-ewtanażja bl-anestetiku. Matul il-flit ġimgħat ta' qabel l-istabbiliment tal-pari tat-tnissil, għandu jiġi rreġistrat il-jum li fih jiġi osservat l-ewwel avveniment ta' riproduzzjoni f'kull replika.

Stabbiliment tal-pari tat-tnissil

Qtugħ tal-pinen u determinazzjoni tas-sess ġenotipiku

40. Id-determinazzjoni tas-sess ġenotipiku permezz tal-qatgħat tal-pinen issir fid-9-10 wpf (jiġifieri l-Ġimgħa 12-13 tat-Test għall-ġenerazzjoni F1). Il-ħut kollu fi ħdan tank jiġi anestetizzat (bl-użu ta' metodi approvati, eż. IACUC) u jittiehed kampjun tat-tessut żgħir mit-tarf dorsali jew ventrali tal-pinna tad-denb ta' kull ħuta biex jiġi determinat is-sess ġenotipiku tal-individwu (29). Il-ħuta minn replika tista' titqiegħed f'gagėg żgħar, jekk possibbli waħda f'kull gagėg, fit-tank replika. Inkella, żewg ħutiet jistgħu jinżammu f'kull gagėg jekk ikunu distingwibbli minn xulxin. Metodu minnhom hu li tinqata' b'mod differenzjali l-pinna tad-denb (eż. tarf dorsali vs ventrali) meta jittiehed il-kampjun tat-tessut.
41. Is-sess ġenotipiku tal-medaka jiġi determinat b'gene identifikat u sekwenzjat (*dmy*) li jinsab fuq il-kromożoma Y. Il-preżenza tad-*dmy* tindika individwu XY indipendentement mill-fenotip, filwaqt li n-nuqqas ta' *dmy* jindika individwu XX indipendentement mill-fenotip (30); (31). Jiġi estratt l-aċidu nuklejku deossiribożi (DNA) minn kull qatgħa ta' pinna u l-preżenza jew l-assenza ta' *dmy* tkun tista' tiġi determinata b'metodi ta' reazzjoni tal-katina tal-polimerażi (PCR) (irreferi għall-Appendiċi 9 fil-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, jew għall-Appendiċijiet 3 u 4 f'(29).

Stabbiliment tal-pari tat-tnissil

42. L-informazzjoni dwar is-sess ġenotipiku tintuża biex jiġu stabbiliti l-pari tat-tnissil XX-XY indipendentement mill-fenotip estern li jista' jiġi alterat bl-esponiment għal sustanza kimika tat-test. Fil-jum ta' wara dak li fih jiġi determinat is-sess ġenotipiku ta' kull ħuta, jintgħażlu b'mod aleatorju żewg ħutiet XX u żewg ħutiet XY minn kull replika u jiġu stabbiliti żewg pari tat-tnissil XX-XY. Jekk replika ma jkollhiex żewg ħutiet XX jew żewg ħutiet XY, għandu jinkiseb il-ħut xieraq minn repliki oħra fi ħdan it-trattament. Il-priorità

hi li jkun hemm in-numru rakkomandat ta' pari tat-tnissil repliki (12) f'kull trattament u fil-kontrolli (24). Hutan b'anormalitajiet ovvjji (problemi fil-bużżieqa tal-ghawm, deformitajiet fis-sinsla, varjazzjonijiet estremi fid-daqs, eċċ.) ikun prekluz meta jiġu stabbiliti l-pari tat-tnissil. Matul il-fażi riproduttiva għall-F1, kull tank replika għandu jkun fih par tat-tnissil wieħed biss.

Kampjunar ta' subadulti u valutazzjoni tal-punti ta' tmiem

Kampjunar ta' hut f'pari mhux tat-tgħammir

43. Wara l-issettjar tal-pari tat-tnissil, il-hut mhux magħżul għal tgħammir ulterjuri jinqatel bl-ewtanażja għall-kejl tal-punti ta' tmiem subadulti fil-Ġimgha 12-13 tat-Test (F1). Hu estremament importanti li l-hut jiġi mmanigġjat b'tali mod li s-sess ġenotipiku determinat għall-ghazla tal-pari tat-tgħammir ikun għadu jista' jiġi traċċat għal huta individwali. Id-data kollha miġbura tiġi analizzata fil-kuntest tas-sess ġenotipiku tal-hut speċifiku. Kull huta tintuża għal varjetà ta' kejljiet tal-punti ta' tmiem inklużi: determinazzjoni tar-rati ta' sopravivenza ta' hut li għadu qed jikber/subadult (Ġimgha 7-12/13 tat-Test (F1), tkabbir fit-tul (tul standard jista' jitkejjel jekk il-pinna tad-denb tkun tqassret minhabba l-kampjunar għall-analiżi tas-sess ġenetiku. It-tul totali jista' jitkejjel jekk jittiehed kampjun ta' parti biss mill-pina tad-denb, dorsali jew ventrali, għad-*dmy*) u l-massa tal-ġisem (jiġifieri l-piż imxarrab, ixxottat bit-taptip) l-mRNA tal-*vtg* tal-fwied (jew il-VRG) u l-papilli tal-pinna anali (ara t-Tabelli 1 u 2). Kun af li l-piżijiet u t-tul tal-pari tat-tnissil huma meħtieġa wkoll għall-kalkolu tat-tkabbir medju fi grupp tat-trattament.

Kampjunar tat-tessuti u kejl tal-vitellogenina

44. Il-fwied jinqata', u għandu jinħażen f' ≤ -70 °C sal-kejl tal-mRNA tal-*vtg* (jew il-VTG). Id-denb tal-hut, inkluża l-pinna anali, jiġi preservat f'fissattiv xieraq (eż. ta' Davidson) jew jittiġhidlu ritratt biex il-papilli tal-pinna anali jkun jistgħu jingħaddu f'data aktar tard. Jekk dan ikun mixtieq, jista' jittiehed kampjun ta' tessuti oħra (jiġifieri gonad) u dawn jistgħu jiġu preservati f'dan il-hin). Il-konċentrazzjoni tal-VTG tal-fwied għandha tiġi kwantifikata b'teknika ELISA omologa (ara l-proċeduri rakkomandati għall-medaka fl-Appendiċi 6 fil-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness). Inkella, il-metodi għall-kwantifikazzjoni tal-mRNA tal-*vtg*, jiġifieri l-estrazzjoni tal-mRNA tal-ġene *vtg I* minn kampjun tal-fwied u kwantifikazzjoni tan-numru ta' kopji tal-ġene *vtg I* (għal kull ng tal-mRNA totali) bil-PCR kwantitattiva, ġew stabbiliti mill-EPA tal-Istati Uniti (29). Minflok ma jiġi determinat in-numru ta' kopji tal-ġene *vtg* fil-gruppi tal-kontroll u tat-trattament, metodu aktar effiċjenti fir-rizorsi u anqas teknikament diffiċli hu li jiġi determinat it-tibdil (ta' drabi) relattiv fl-espressjoni tal-*vtg I* mill-gruppi tal-kontroll u tat-trattament.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

45. F'ċirkustanzi normali, medaka rġiel sesswalment maturi biss ikollhom papilli, li jizviluppaw fuq il-pjastri kongunti ta' ċerti raj tal-pinna anali bħala karatteristika sesswali sekondarja, filwaqt li jipprovdu bijomarkatur potenzjali għal effetti ta' intereferenza endokrinali. Il-metodu tal-għadd tal-papilli tal-pinen anali (in-numru ta' pjastri kongunti bil-papilli) jingħata fl-Appendiċi 8. Barra minn hekk, in-numru ta' papilli tal-pinen anali għal kull individwu jintuża biex dak l-individwu jiġi karatterizzat bħala raġel jew mara esternament fenotipiċi għall-fini tal-kalkolu ta' proporzjon sempliċi tas-sessi għal kull replika. Medaka bi kwalunkwe numru akbar minn 0 tiġi definita bħala raġel; medaka b'ebda papilla tal-pinna anali tiġi definita bħala mara.

Valutazzjoni tal-fekondità u tal-fertilità

46. Il-fekondità u l-fertilità jiġu vvalutati fil-Ġimghat 1 sa 3 tat-Test fil-generazzjoni F0 u l-Ġimghat 15 sa 17 tat-Test fil-generazzjoni F1. Il-bajd jingabar ta' kuljum minn kull par tat-tgħammir għal 21 jum konsekuttiv. Il-bajd jitneħħa bil-galbu min-nisa maqbuda u/jew jingibdu b'sifun mill-qiegħ tal-akkwarju kull għodwa. Kemm il-fekondità kif ukoll il-fertilità jiġu reġistrati ta' kuljum għal kull par replika tat-tgħammir. Il-fekondità hi definita bħala n-numru ta' bajd riprodotti, u l-fertilità hi funzjonalment definita bħala n-numru ta' bajd fertilizzat u vijabbli fil-ħin tal-għadd. L-għadd għadu jsir mill-aktar fis possibbli wara l-ġbir tal-bajd.
47. Il-fekondità tar-repliki tiġi reġistrata ta' kuljum bħala n-numru ta' bajd għal kull par tat-tgħammir li jiġi analizzat bil-proċeduri statistiċi rakkomandati bl-użu tal-medji tar-repliki. Il-fertilità tar-repliki hi s-somma tan-numru ta' bajd fertili prodott minn par tat-tgħammir diviża bis-somma tan-numru ta' bajd prodott minn dak il-par. Statistikament il-fertilità tiġi analizzata bħala proporzjon għal kull replika. Il-kapaċità ta' tifqis tar-repliki hi n-numru ta' mfaqqs diviż bin-numru ta' embrijuni mgħobbija (tipikament 20). Statistikament il-kapaċità ta' tifqis tiġi analizzata bħala proporzjon għal kull replika.

Kampjunar ta' adulti u valutazzjoni tal-punti ta' tmiem

Kampjunar ta' ħut f'pari tat-tgħammir

48. Wara l-Ġimgha 17 tat-Test (jiġifieri wara li tibda b'suċċess il-generazzjoni F2), l-adulti F1 jinqatlu bl-ewtanażja u jiġu vvalutati diversi punti ta' tmiem (ara t-Tabelli 1 u 2). Tittiehed immaġni tal-pinna anali għall-valutazzjoni tal-papilli tal-pinen anali (ara l-Appendiċi 8), u/jew id-denb, eżatt wara t-toqba, jitneħħa u jiġi ffixsat għall-għadd tal-papilli aktar tard. Jista' jittiehed kampjun ta' biċċa mill-pinna tad-denb u din tista' tiġi arkivjata f'dan il-waqt għall-verifika tas-sess ġenetiku (*dmy*) jekk din tkun mixtieqa. Jekk ikun hemm bżonn, jista' jittiehed kampjun tat-tessut biex tiġi ripetuta l-analiżi tad-*dmy* għall-verifika tas-sess ġenetiku ta' ħuta speċifika. Il-kavità tal-ġisem tinfetaħ biex tkun tista' ssir perfużjoni b'fissattivi xierqa (eż. ta' Davidson) qabel it-tgħaddis tal-ġisem shiħ fil-fissattiv.

Madankollu, jekk jitwettaq pass xieraq ta' permeabilizzazzjoni qabel il-fissazzjoni, il-kavità tal-gisem ma jkollhiex bżonn tinfetaħ.

Istopatoloġija

49. Kull huta tiġi evalwata istoloġikament għall-patoloġija fit-tessut gonadali (30); (29). Kif imsemmi fil-paragrafu 33, punti ta' tmiem mekkanistiċi ohra evalwati f'dan l-assaġġ (jiġifieri l-VTG, l-SSCs u ċerti effetti tal-istopatoloġija gonadali) jistgħu jkunu influwenzati minn tossiċitajiet sistemiċi jew oħrajn. Konsegwentement, l-istopatoloġija tal-fwied u tal-kliewi tista' tiġi vvalutata wkoll f'dettall biex jinftiehem aħjar kwalunkwe rispons f'punti ta' tmiem mekkanistiċi. Madankollu, jekk ma jsirux dawn l-evalwazzjonijiet dettaljati, anormalitajiet grossi osservati b'mod inċidentali matul l-evalwazzjoni istopatoloġika xorta waħda għandhom jiġu nnotati u rapportati. "Il-qari 'l isfel" mill-ogħla grupp tat-trattament (meta mqabbel mal-kontroll) għal trattament b'ebda effett jista' jiġi kkunsidrat, iżda hu rakkomandat li tiġi kkonsultata l-gwida dwar l-istopatoloġija (29). Tipikament, il-kampjuni kollha jiġu proċessati/sezzjonati, u wara dan jinqraw mill-patologu. Jekk jintuża approċċ ta' "qari 'l isfel", hu nnotat li l-proċedura Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) tuża l-aspettattiva li hekk kif jiżdiedu l-livelli tad-doża, l-impatt bijoloġiku (il-patoloġija) jiżdied ukoll. Għaldaqstant, wiehed jitlef is-saħħa jekk iħares biss lejn doża għolja waħda mingħajr ebda doża intermedja. Jekk l-analiżi statistika ma tkunx neċessarja biex jiġi determinat li d-doża ma għandha ebda effett, dan l-approċċ jista' jkun aċċettabbli. Il-fenotip tal-gonadi jinkiseb b'din l-evalwazzjoni wkoll

Osservazzjonijiet ohra

50. Il-MEOGRT jipprovdi *data* li tista' tintuża (eż. f'approċċ tal-piż ta' evidenza) biex jiġu evalwati fl-istess hin tal-anqas żewġ tipi ġenerali ta' perkorsi tal-eżitu avvers (AOPs) li jintemmu f'indeboliment riproduttiv: (a) perkorsi medjati bl-endokrina li jinkludu interferenza tal-assi endokrinali ipotalamiku-pitwitarju-gonadali (HPG); u, (b) perkorsi li jikkawżaw tnaqqis fis-sopravivenza, fit-tkabbir (tul u piż), u fir-riproduzzjoni permezz ta' tossiċità medjata mhux permezz tal-endokrina. Il-punti ta' tmiem tipikament jitkejlu f'testijiet tat-tossiċità kronika bħat-test taċ-ċiklu tal-ħajja sħiħ u t-test tal-istadju bikri tal-ħajja wkoll huma inklużi f'dan it-test u jistgħu jintużaw biex jiġu evalwati l-perikli miġjuba kemm minn modalitajiet ta' azzjoni tossiċi medjati mhux mill-endokrina kif ukoll minn perkorsi tat-tossiċità medjati mill-endokrina. Matul it-test, l-osservazzjonijiet tal-imġiba għandhom isiru ta' kuljum, u kwalunkwe mġiba mhux tas-soltu għandha tiġi notata. Barra minn hekk, kwalunkwe mortalità għandha tiġi registrata u s-sopravivenza sal-qtil tal-ħut (gimġha 6/7 tat-test), is-sopravivenza wara l-qtil sal-kampjunar subadult (f'9-10 wpf), u s-sopravivenza mit-tqegħid f'pari sal-kampjunar tal-ħut adult għandhom jiġu kkalkolati.

Tabella 1: Harsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-MEOGRT*

Stadju tal-hajja	Punt ta' tmiem	Ġenerazzjoni
Embrijun (2 wpf)	Tifqis (% u żmien sat-tifqis)	F1, F2
Ħut li għadu qed jikber (4 wpf)	Sopravivenza	F1
Subadult (9 jew 10 wpf)	Sopravivenza	F1
	Tkabbir (tul u piż)	
	Vitellogenina (mRNA jew proteina)	
	Karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinna anali)	
	Proporzjon tas-sess estern	
	Żmien għall-lel riproduzzjoni	
Adult (12-14-il wpf)	Riproduzzjoni (fekondità u fertilità)	F0, F1
Adult (15 wpf)	Sopravivenza	F1
	Tkabbir (tul u piż)	
	Karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinna anali)	
	Istopatoloġija (gonad, fwied, kilwa)	

*Dawn il-punti ta' tmiem għandhom jiġu analizzati statistikament

KRONOLOĠIJA

51. Kronoloġija għall-MEOGRT murija fit-Tabella 2 turi t-test. L-MEOGRT tinkludi 4 ġimgħat esponiment għal adulti F0 u 15-il ġimgħa esponiment għall-ġenerazzjoni F1, u perjodu ta' esponiment għat-tieni ġenerazzjoni (F2), sat-tifqis (2 wpf). L-attività matul l-MEOGRT hi spjegata fl-Appendiċi 9.

Tabella 2: Kronoloġija tal-punti ta' tmiem tal-esponiment u tal-kejl għall-MEOGRT.

Kronoloġija tal-Esponiment u tal-Punti ta' Tmiem tal-MEOGRT																									
F0	1	2	3	4																					
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15							
F2																		1	2						
Ġimgha tat-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19						
Stadju tal-Hajja					Embrijun					Larva					Hut li għadu qed jikber					Subadult			Adult		
Punti Ahħarin																									
Fekondità	F ₀														F ₁										
Fertilità	F ₀														F ₁										
Bokkaport						F ₁													F ₂						
Sopravivenza						F ₁						F ₁						F ₁							
Tkabbir				F ₀								F ₁						F ₁							
Vitelloġenina												F ₁													
Sess sekondarju												F ₁						F ₁							
Istopatoloġija																		F ₁							
Ġimgha tat-Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19						
• Disinn sperimentali għandu seba' gruppi ta' repliki ○ Hamsa għat-trattamenti bis-sustanza kimika tat-test ○ Tnejn għat-trattamenti tal-kontroll (erba' jekk jintuza solvent) • Disinn fi ħdan il-grupp ○ Tnax-il replika għar-riproduzzjoni, patoloġija adulta u SSC (Ġmt 10 sa 18) ○ Sitt repliki għat-tifqis, sopravivenza, Vtg; u - SSC u tkabbir subadulti (Ġmt 1 sa 9) SSC: karatteristiċi sesswali sekondarji; Ġmt: ġimghat; Vtg: vitelloġenina																									

RAPPORTAR TAD-DATA

Analizi statistika

52. Peress li s-sess ġenotipiku jiġi determinat għall-ħut kollu tat-test, id-*data* għandha tiġi analizzata għal kull sess ġenotipiku b'mod separat (jiġifieri rġiel XY u nisa XX). Nuqqas milli jsir hekk inaqqas bil-bosta s-saħħa statistika ta' kwalunkwe analizi. Idealment, l-analizzijiet statistiċi tad-*data* għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument tal-OECD dwar l-Approċċi Kurrenti fl-Analizi Statistika tad-*Data* dwar l-Ekotossiċità: Gwida għall-Applikazzjoni (32). L-Appendiċi 10 jipprovdi gwida ulterjuri għall-Analizi Statistika.

53. Id-disinn tat-test u l-għażla tat-testijiet statistiċi għandhom jippermettu saħħa adegwata li jiġu individwati tibdiliet ta' importanza bijoloġika f'punti ta' tmiem fejn trid tiġi rapportata NOEC (32). Ir-rapportar tal-konċentrazzjonijiet tal-effett u l-parametri rilevanti jista' jiddependi fuq il-qafas regolatorju. Għandu jkun identifikat it-tibdil perċentwali f'kull punt ta' tmiem li jkun importanti għad-detezzjoni jew għall-istima. Id-disinn sperimentali għandu jitfassal biex jippermetti dan. Mhuwix probabbli li l-istess tibdil perċentwali

japplika għall-punti ta' tmiem kollha, lanqas ma hu probabbli li jkun jista' jiffassal esperiment fattibbli li jissodisfa dawn il-kriterji għall-punti ta' tmiem kollha, u għalhekk hu importanti li wieħed jiffoka fuq il-punti ta' tmiem li huma importanti għall-esperiment rispettiv biex l-esperiment jiffassal kif xieraq. Flow diagram statistiku u l-gwida huma disponibbli fl-Appendiċi 10 biex iservu ta' għajjnuna fit-trattament tad-*data* u fl-għażla tal-aktar test statistiku jew mudell xieraq li għandu jintuża. Jistgħu jintużaw approċċi statistiċi oħra, dment li jkunu xjentifikament ġustifikati.

54. Se jkun neċessarju li l-varjazzjonijiet jiġu analizzati f'kull sett ta' repliki bl-użu ta' analiżi tal-varjanza jew proċeduri b'tabella ta' kontingenza u li jintużaw metodi ta' analiżi statistika xierqa u suffiċjenti abbażi ta' din l-analiżi. Biex isir tqabbil multiplu bejn ir-riżultati fil-konċentrazzjonijiet individwali u daww għall-kontrolli, il-proċedura ta' tendenza rigressiva (eż. it-test ta' Jonckheere-Terpstra) hi rakkomandata għal risponsi kontinwi. Meta d-*data* ma tkunx konsistenti ma' konċentrazzjoni-rispons monotoni, għandu jintuża t-test ta' Dunnett jew it-test ta' Dunn (wara trasformazzjoni adegwata tad-*data*, jekk ikun hemm bżonn).
55. Għall-fekondità, l-għadd tal-bajd isir kuljum, iżda jista' jiġi analizzat bħala l-għadd totali tal-bajd jew bħala kejl ripetut. L-Appendiċi 10 jipprovdi dettalji dwar kif jiġi analizzat dan il-punt ta' tmiem. Għad-*data* dwar l-istopatoloġija li tkun fil-forma ta' punteġġi tas-severità, ġie żviluppat test statistiku ġdid, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).
56. Għandu jiġi rapportat kwalunkwe punt ta' tmiem osservat fi trattamenti kimiċi li jkunu differenti b'mod sinifikanti minn kontrolli xierqa.

Kunsiderazzjonijiet għall-analiżi tad-*data*

Użu ta' livelli tat-trattament f'riskju

57. Jiġu kkunsidrati bosta fatturi meta jiġi stabbilit jekk replika jew trattament shih jurux tossiċità ċara u għandhomx jitnehhew mill-analiżi. Tossiċità ċara hi definita bħala >4 mortalitajiet fi kwalunkwe replika bejn it-3 wpf u d-9 wpf li ma jkunux jistgħu jiġu spjegati minn żball tekniku. Sinjali oħra ta' tossiċità ċara jinkludu emorraġija, imġiba anormali, xejriet tal-għawn anormali, anoressija u kwalunkwe sinjal kliniku ieħor ta' mard. Għal sinjali subletali ta' tossiċità, jista' jkun hemm bżonn ta' evalwazzjonijiet kwalitattivi, u dejjem għandha ssir referenza għall-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (ilma nadif biss). Jekk it-tossiċità ċara tkun evidenti fl-ogħla trattament(i), hu rakkomandat li daww it-trattament jiġu ċċensurati mill-analiżi.

Kontrolli b'solvent

58. L-użu ta' solvent għandu jiġi kkunsidrat biss bħala l-aħħar rikors, wara li jkun għew ikkunsidrati l-għażliet l-oħra kollha ta' twassil. Jekk jintuża solvent, f'dak il-każ għandu jsir fl-istess hin kontroll b'ilma ta' dilwizzjoni. Fi tmiem it-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent. Dan isir permezz ta' paragon statistiku tal-grupp ta' kontroll b'solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. L-aktar punti ta' tmiem rilevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analiżi huma d-determinanti tat-tkabbir (piż), peress li dawn jistgħu jkun affettwati permezz ta' tossiċitajiet ġeneralizzati. Jekk jinstabu differenzi statistikament sinifikanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-gruppi tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u tal-kontroll b'solvent, għandu jintuża l-aħjar ġudizzju professjonali biex jiġi determinat jekk il-validità tat-test hix f'riskju. Jekk iż-żewġ kontrolli jvarjaw, it-trattamenti esposti għas-sustanza kimika għandhom jitqabblu mal-kontroll b'solvent sakemm ma jkunx magħruf li jkun preferut it-tqabbil mal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn iż-żewġ gruppi tal-kontroll, hu rakkomandat li t-trattamenti esposti għas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mar-raggruppati (gruppi tal-kontroll b'solvent u bl-ilma ta' dilwizzjoni), sakemm ma jkunx magħruf li t-tqabbil mal-grupp tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni jew tal-kontroll b'solvent biss hu preferut.

Rapport tat-test

59. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test: l-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-karatteristiċi fiżikokimiċi;

- *Data* dwar l-identifikazzjoni tas-sustanza kimika.

Sustanza monokostitwenti:

- id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżikokimiċi rilevanti addizzjonali;
- identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impuritajiet bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).

Sustanza multikostitwenti, UVCBs u taħlitiet:

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

Speċijiet tat-test:

- L-isem xjentifiku, ir-razza jekk disponibbli, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-immaniġġjar sussegwenti.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

- Il-fotoperjodu/i;
- Id-disinn tat-test (eż. id-daqs tal-kompartiment, il-materjal u l-volum tal-ilma, in-numru ta' kompartimenti u ta' repliki tat-test, in-numru ta' mfaqqs għal kull replika);
- Il-metodu ta' thejjija 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 ta' dilwizzjoni: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-kloru residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), is-solidi sospiżi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;
- Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom;
- Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, it-temperatura (ta' kuljum) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;
- Informazzjoni dettaljata dwar it-tagħlif (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Ir-riżultati:

- Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji dwar il-validazzjoni ġenerali;
- Id-*data* għall-kontroll (flimkien mal-kontroll b'solvent meta jintuża) u għall-gruppi tat-trattament kif ġej, it-tifqis (il-kapaċità ta' tifqis u ż-żmien sat-tifqis) għall-F1 u għall-F2, is-sopravivenza wara t-tifqis għall-F1, it-*tkabbir* (tul u piż tal-ġisem) għall-F1, is-sess ġenotipiku u d-differenzazzjoni sesswali (eż. karatteristiċi sesswali sekondarji fuq il-baži tal-papilli tal-pinen anali u istologija gonadali) għall-F1, is-sess fenotipiku għall-F1, il-karatteristiċi sesswali sekondarji (papilli tal-pinen anali) għall-mRNA tal-*vtg* tal-F1 (jew il-proteina tal-VTG) għall-F1, valutazzjoni tal-istopatoloġija (gonad, fwied u kilwa) għall-F1 u r-riproduzzjoni (fekondità u fertilità) għall-F0, F1; (ara t-Tabelli 1 u 2).
- L-approċċ għall-analiżi statistika (analiżi ta' rigressjoni jew analiżi tal-varjanza) u t-trattament tad-*data* (it-testijiet statistiċi u l-mudelli użati);
- Il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) għal kull rispons ivvalutat;

- Il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) għal kull rispons ivvalutat ($f^*p = 0,05$); L-EC_x għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 90 % jew 95 %) u graff tal-mudell imdahhal għall-kalkolu tagħha, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni rispons, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-erruri standard tagħhom.
 - Kwalunkwe devjazzjoni minn dan il-metodu ta' ttestjar u devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni, u kunsiderazzjonijiet tal-konsegwenzi potenzjali fuq l-eżitu tat-test.
60. Għar-rizultati tal-kejljiet tal-punti ta' tmiem, għandhom jiġu pprezentati l-valuri medji u d-devjazzjonijiet standard tagħhom (kemm fuq bażi ta' repliki kif ukoll fuq bażi ta' konċentrazzjoni, jekk possibbli).

DOKUMENTAZZJONI

- (1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (1) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K u Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
- (2) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (3) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
- (4) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T u Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
- (5) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T u Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
- (6) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H u Honjo T. (2002). Effects of 17 β -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71-80.
- (7) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H i Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- (8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H u Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
- (9) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M u Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.

- (10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M u Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 β -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
- (11) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T u Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
- (12) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponibbli fuq: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (13) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P u McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
- (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.), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (15) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ u Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69-92.
- (16) Denny JS, Spehar RL, Mead KE u Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
- (17) Koger CS, Teh SJ u Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
- (18) Kinoshita M, Murata K, Naruse K u Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.
- (19) Gormley K u Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
- (20) Il-Kapitolu C.15 ta' dan l-Anness, Hut, Test tat-Tossicità Fuq Terminu Qasir fuq l-Istadji tal-Embrijuni u tal-Qixx fil-Borża.

- (21) Il-Kapitolu C.37 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Ħut Fuq 21 Jum: Skrinjar fuq Terminu Qasir għal Attività Estroġenika u Androġenika, u Inibizzjoni tal-Aromatażi.
- (22) Il-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut.
- (23) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Assaġġ dwar ir-Riproduzzjoni Fuq Terminu Qasir tal-Ħut.
- (24) Il-Kapitolu C.47 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità fl-Istadju tal-Hajja Bikrija.
- (25) Il-Kapitolu C.49 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta fuq l-Embrijuni tal-Ħut (FET).
- (26) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L u Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (27) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M u Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
- (28) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (29) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M u Scharl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245-251.
- (30) Shinomiya, A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S u Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
- (31) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (l-annessi għal din il-pubblikazzjoni jeżistu bħala dokument separat), OECD Publishing, Pariġi.
- (32) Green JW, Springer TA, Saulnier AN u Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Sustanza kimika: Sustanza jew taħlita

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku

Fekondità = numru ta' bajd;

Fertilità = numru ta' bajd vijabbli/fekondità;

Tul sal-furketta (FL): jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sal-aħħar tax-xewk tal-pinen f'nofs id-denb u jintuża f'ħut fejn hu diffiċli li wiehed jgħid fejn tispicċa l-kolonna vertebrali www.fishbase.org

Kapaċità ta' tifqis = imfaqqsa/numru ta' embrijuni mgħobbija f'inkubatur

IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee

Tul standard (SL): jirreferi għat-tul ta' ħuta mkejje mill-ponta tal-geddum sat-tarf ta' wara tal-aħħar vertebra jew sat-tarf ta' wara tal-porzjon midlateral tal-hypural plate. Fi kliem sempliċi, dan il-kejl jeskludi t-tul tad-denb. (www.fishbase.org)

Tul totali (TL) jirreferi għat-tul mill-ponta tal-geddum sal-ponta tal-lobu itwal tad-denb, generalment imkejje bil-lobi kkumpressati tul il-linja tan-nofs. Dan hu kejl ta' linja dritta, li ma jitkejjilx fuq il-kurva tal-gisem (www.fishbase.org)

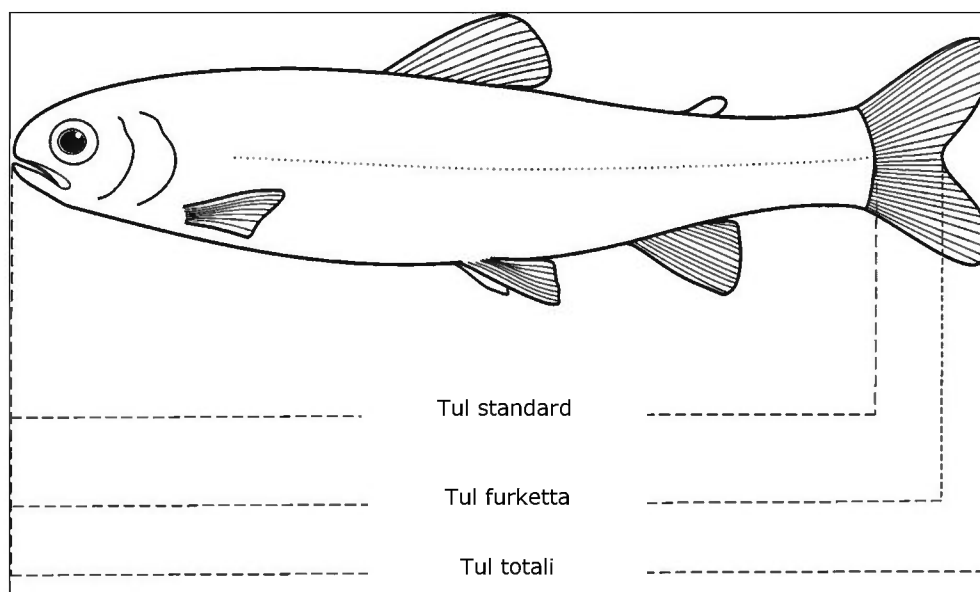


Figura 1: Deskrizzjoni tat-tulijiet differenti użati

ECx: (Konċentrazzjoni effettiva għal effett ta' x %) hi l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organizmi tat-test f'perjodu ta' esponiment partikolari meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC50 hi konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' esponiment definit.

Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali.

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata.

Rata ta' tagħbija: Il-piż imxarrab tal-ħut skont il-volum ta' ilma.

Konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) hi l-anqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test li fiha tiġi osservata s-sustanza kimika biex ikollha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. Madankollu, il-konċentrazzjonijiet tat-test kollha li jkunu oġġa mil-LOEC għandu jkollhom effett dannuż daqs jew ikbar minn dawk osservati fl-LOEC. Meta dawn iż-żewġ kundizzjonijiet ma jkunux jistgħu jiġu ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni shiha dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC). L-Appendiċijiet 5 u 6 jipprovdu gwida.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC50): hi l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hi stmata li tkun letali għal 50 % tal-organizmi tat-test fid-durata tat-test.

Konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) hi l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC, li meta mqabbla mal-kontroll, ma jkollha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$), f'perjodu ta' esponiment ddikjarat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Densità tal-istokkjar: L-għadd ta' ħut għal kull volum ta' ilma.

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

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

VTG: Vitelloġenina hi prekursor tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment isehh f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

WPF: Ġimġhat ta' wara l-fertilizzazzjoni

Appendiċi 2**XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI**

Sustanza	Konċentrazzjoni ta' limitu
Materja partikulata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
Ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

Appendiċi 3

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST GĦALL-MEOGRT

- | | |
|---|---|
| 1. Speċijiet rakkomandati | Medaka Ġappuniża (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 2. Tip ta' test | Bi fluss kontinwu |
| 3. Temperatura tal-ilma | It-temperatura nominali tat-test hi ta' 25°C. It-temperatura medja tul it-test kollu f'kull tank hi ta' 24-26 °C. |
| 4. Kwalità tal-illuminazzjoni | Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa' u ~150 lumen/m ²) (~150 lux).

16-il siegħa dawl, tmien sigħat dlam |
| 6. Rata ta' tagħbija | F0: żewġ adulti/replika; F1: imnedija b'massimu ta' 20 bajda (embrijun)/replika, imnaqqs għal 12-il embrijun/replika fit-tifqis u mbagħad 2 adulti (pari tat-tgħammir XX-XY) fid-9-10 wpf għall-faži riproduttiva |
| 7. Volum minimu utilizzabbli tal-1,8 l (eż., daqs tal-kompartiment tat-test: 18x9x15-il cm) kompartiment tat-test | |
| 8. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test | Minimu ta' ħames drabi ta' tiġdid tal-volum/jum sa 16-il darba ta' tiġdid tal-volum/jum (jew fluss ta' 20 ml/min) |
| 9. Età tal-organizmi tat-test fil-bidu | F0: > 12-il wpf iżda hu rakkomandat li ma jinqabżux is-16-il wpf |
| 10. In-numru ta' organizmi għal kull replika | F0: 2 ħutiet (par ta' raġel u mara); F1: massimu ta' 20 ħuta (bajd)/replika (prodotti mill-pari tat-tgħammir tal-F0 u tal-F1). |
| 11. In-numru ta' trattamenti | Ħames trattamenti bis-sustanza kimika tat-test flimkien mal-kontroll(i) xieraq/xierqa |
| 12. In-numru ta' repliki għal kull trattament | Minimu ta' sitt repliki għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u minimu ta' 12-il replika għall-kontroll, u għall-kontroll b'solvent, jekk użati (in-numru ta' repliki jirdoppja fi ħdan il-faži tar-riproduzzjoni fil-F1) |
| 13. In-numru ta' organizmi għal kull test | Minimu ta' 84 ħuta fl-F0 u 504 fl-F1. (Jekk jintuża kontroll b'solvent, 108 ħutiet fl-F0 u 648 ħuta fl-F1). L-unità li tingħadd hi l-postelewteroembrijun. |
| 14. Reġim tal-ġhalf | Il-ħut jintema' l-gambli tal-ilma mielaħ, <i>Artemia</i> spp., (nauplii li jkollu 24 siegħa) <i>ad libitum</i> , supplimentat b'ikel fil-forma ta' laqx kummerċjalment disponibbli jekk ikun hemm bżonn (Skeda ta' tagħlif bħala eżempju biex jiġu żgurati tkabbir u żvilupp adegwati b'sostenn |

	tar-riproduzzjoni robusta tista' tinstab fl-Appendiċi 6).
15. Ossigenazzjoni	Ebda sakemm l-ossigenu dissolt ma joqrobx lejn <60 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja
16. Ilma ta' dilwizzjoni	Ilma tal-wiċċ, tal-bir jew rikostitwit jew ilma tal-vit deklorat nadif.
17. Perjodu ta' esponiment	Primarjament 19-il ġimgħa (mill-F0 sat-tifqis tal-F2)
18. Punti ta' tmiem bijoloġiċi (primarji)	Kapaċità ta' tifqis (F1 u F2); sopravivenza (F1, mit-tifqis sar-4 wpf (tmiem il-larva/bidu tal-faġi tal-ħut li għadu qed jikber), mir-4 sad-9 (jew l-10) wpf (bidu tal-faġi tal-ħut li għadu qed jikber sa subadult) u minn 9 sa 15-il wpf (subadult sa terminazzjoni tal-adult)); tkabbir (F1, tul u piż f'9 u 15-il wpf); karatteristiċi sesswali sekondarji (F1, papilli tal-pinen anali fid-9 u fil-15-il wpf); vitelloġenina (F1, mRNA tal- <i>vtg</i> jew proteina tal-VTG fil-15-il wpf); sess fenotipiku (F1, permezz tal-istoloġija gonadali fil-15-il wpf); riproduzzjoni (F0 u F1, il-fekondità u l-fertilità għal 21 jum); ħin sar-riproduzzjoni (F1); u istopatoloġija (F1, gonad, fwied u kilwa fil-15-il wpf)
19. Il-kriterji ta' validità tat-test	Ossigenu dissolt ta' ≥ 60 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja; temperatura medja tal-ilma ta' 24-26°C matul it-test; riproduzzjoni b'suċċess ta' ≥ 65 % tan-nisa fil-kontroll(i); fekondità medja ta' kuljum ta' ≥ 20 bajd fil-kontroll(i); kapaċità ta' tifqis ta' ≥ 80 % (medja) fil-kontrolli (f'kull waħda mill-F1 u mill-F2); sopravivenza wara t-tifqis sat-3 wpf ta' ≥ 80 % (medja) u minn 3 wpf sat-terminazzjoni għall-ġenerazzjoni ta' ≥ 90 % (medja) fil-kontrolli (F1), il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni għandhom jinżammu b'mod sodisfaċenti fi ħdan ± 20 % tal-valuri medji mkejla.

Appendiċi 4

GWIDA DWAR IL-VALURI TIPIĊI TAL-KONTROLL

Ta' min jinnota li dawn il-valuri tal-kontroll huma bbażati fuq numru limitat ta' studji ta' validazzjoni, u jistgħu jkunu soġġetti għall-emendar fid-dawl ta' esperjenza ulterjuri.

Tkabbir

Il-kejljiet tal-piż u tat-tul jittieħdu għall-ħut kollu fil-kampjun fid-9 (jew fl-10) u fil-15-il ġimġha wara l-fertilizzazzjoni (wpf). Is-segwitu ta' dan il-protokoll irendi l-piżijiet imxarrba mistennija fid-9 wpf ta' 85-145 mg għall-irġiel u ta' 95-150 mg għan-nisa. Il-piżijiet mistennija fil-15-il wpf huma ta' 250-330 mg għall-irġiel u ta' 280-350 mg għan-nisa. Filwaqt li jista' jkun hemm devjazzjonijiet sostanzjali minn dawn il-meded għal ħut individwali, piżijiet medji tal-kontroll sostanzjalment barra minn dawn il-meded, speċjalment anqas, ikunu jissuġġerixxu problemi fit-tagħlif, fil-kontroll tat-temperatura, fil-kwalità tal-ilma, mard jew xi tahlita ta' dawn il-fatturi.

Tifqis

Is-suċċess tat-tifqis fil-kontrolli tipikament ikun madwar id-90 %, madankollu mhumieq rari valuri baxxi sa 80 %. Suċċess tat-tifqis ta' anqas minn 75 % jista' jindika aġitazzjoni insuffiċjenti tal-bajd tal-iżvilupp jew attenzjoni inadegwata fl-immaniġġjar tal-bajd bħan-nuqqas ta' tneħħija fil-ħin tal-bajd mejjet li jwassal għal infestazzjoni fungali.

Sopravivenza

Ir-rati ta' sopravivenza sat-3 wpf mit-tifqis u wara t-3 wpf normalment ikunu ta' 90 % jew aktar għall-kontrolli iżda r-rati ta' sopravivenza fl-istadji bikrin tal-ħajja li jiżlu sa 80 % għall-kontrolli mhumieq allarmanti. Rati ta' sopravivenza fil-kontrolli ta' anqas minn 80 % ikunu ta' tħassib u jistgħu jindikaw tindif insuffiċjenti tal-akkwarji li jwassal għal telf tal-ħut larvali permezz ta' mard jew minħabba soffokazzjoni minħabba livelli baxxi ta' ossiġenu dissolt. Il-mortalità tista' sseħħ ukoll minħabba korriment matul it-tindif tat-tankijiet u minħabba t-telf ta' ħut larvali fis-sistema tad-drenagġ tat-tank.

Il-gene vitellogenina

Filwaqt li l-livelli assoluti tal-gene *vitellogenina* (*vgt*), espressi bħala kopji/ng tal-mRNA totali, jistgħu jvarjaw ħafna bejn il-laboratorji minħabba l-proċeduri u l-istrumenti użati, il-proporzjon tal-*vgt* għandu jkun madwar 200 darba akbar fin-nisa tal-kontroll kontra l-irġiel tal-kontroll. Mhijiex xi haġa rari li dan il-proporzjon ikun għoli bejn 1000 u 2000, iżda proporzjonijiet anqas minn 200 huma suspettużi u jistgħu jindikaw problemi ta' kontaminazzjoni fil-kampjun jew problemi bil-proċedura u/jew bir-reagenti użati.

Karatteristiċi sesswali sekondarji

Għall-irġiel, il-medda normali ta' Karatteristiċi Sesswali Sekondarji, definiti bħala n-numru totali ta' segmenti fir-raj tal-pinen tal-papilli tal-pinen anali, hi ta' 40-80 segment fid-9-10 wpf. Sal-15-il wpf, il-medda għall-irġiel tal-kontroll għandha tkun ta' madwar 80-120 u ta' 0 għan-nisa tal-kontroll. Għal raġunijiet mhux spjegati, f'każijiet rari ċerti rġiel ma jkollhom ebda papilla preżenti sad-9 wpf iżda peress li l-irġiel tal-kontroll kollha jiżviluppaw papilli sal-15-il wpf, dan aktarx li jkun ikkawżat minn żvilupp tardiv. Il-preżenza ta' papilli fin-nisa tal-kontroll tindika l-preżenza ta' rġiel XX fil-popolazzjoni.

Irgiel XX

L-inċidenza normali ta' sfond ta' rġiel XX fil-kultura tidher li hi ta' madwar 4 % jew anqas f'25 °C bl-inċidenza li tiżdied aktar ma tiżdied it-temperatura. Għandhom jittieħdu passi biex jiġi minimizzat il-proporzjon ta' rġiel XX fil-popolazzjoni. Peress li l-inċidenza ta' rġiel XX tidher li għandha komponent ġenetiku u, għalhekk, tintiret, il-monitoraġġ tal-istokk tal-kultura u l-iżgurar li l-irġiel XX ma jintużawx għall-propagazzjoni tal-istokk tal-kultura huma mezz effettiv kif titnaqqas l-inċidenza tal-irġiel XX fil-popolazzjoni.

Attività ta' riproduzzjoni

L-attività ta' riproduzzjoni fir-repliki tal-kontroll għandha tiġi ssorveljata ta' kuljum qabel ma ssir il-valutazzjoni tal-fekondità. Il-pari tal-kontroll jistgħu jiġu vvalutati b'mod kwalitattiv viżwalment għal evidenza ta' attività ta' riproduzzjoni. Sat-12-14-il wpf, ħafna mill-pari tal-kontroll għandhom ikunu qed jirriproduċu. Numri baxxi ta' pari li jirriproduċu sa dan iż-żmien jindikaw problemi potenzjali fis-saħħa, fil-maturità jew fil-benessri tal-ħut.

Fekondità

Ġeneralment, medaka f'saħħithom, magħlufa sew ta' 12-14-il wpf jirriproduċu kuljum, u jipproduċu fil-medda ta' 15 sa 50 bajda kull jum. Il-produzzjoni tal-bajd għal 16 mill-24 par tat-tgħammir tal-kontroll rakkomandati (> 65 %) għandha tipproduċi aktar minn 20 bajda għal kull par kull jum u tista' tilhaq sa madwar 40 bajda kull jum. Anqas minn dan l-ammont jista' jindika pari tar-riproduzzjoni immaturi, mhux magħlufa kif suppost jew mhux f'saħħithom.

Fertilità

Il-perċentwal ta' bajd fertili għall-pari tar-riproduzzjoni tal-kontroll tipikament ikun fil-medda ta' 90 % b'valuri fil-parti medja sa superjuri tad-disgħinijiet li mhumex rari. Rati tal-fertilità ta' anqas minn 80 % għall-bajd tal-kontroll huma suspettużi u jistgħu jindikaw individwi mhux f'saħħithom jew kundizzjonijiet tal-kultura mhux ideali.

Appendiċi 5

EŻEMPJU TA' SKEDA TAT-TAGHLIF

Eżempju ta' skeda tat-tagħlif biex jiġu żgurati tkabbir u żvilupp adegwati b'sostenn tar-riproduzzjoni robusta hu muri fit-Tabella 1. Devjazzjonijiet minn din l-iskeda ta' tagħlif jistgħu jkunu aċċettabbli, iżda hu rakkomandat li dawn jiġu ttestjati biex jiġi verifikat li jkunu osservati tkabbir u riprodurrezzjoni aċċettabbli. Biex tiġi segwita l-iskeda ta' tagħlif sugġerita, il-piż xott tal-gamblu tal-ilma mielaħ għal kull volum ta' sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ irid jiġi determinat qabel ma jinbeda t-test. Dan jista' jsir bl-użin ta' volum differenti tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ li tkun tnixxfet għal 24 siegħa f'60 °C fuq twaġen li jkunu ntiżnu minn qabel. Biex jingħata kont lill-piż tal-imluħ fis-sospensjoni magħquda, volum identiku tal-istess soluzzjoni tal-melħ użata fis-sospensjoni magħquda għandu jitnixxef, jintiżen u jitnaqqas ukoll mill-piż tas-sospensjoni magħquda xxottata tal-gamblu tal-ilma mielaħ. Inkella, il-gamblu tal-ilma mielaħ jista' jiġi ffiltrat u jitlaħlaħ b'ilma distillat qabel ma jiġi xxottat, u b'hekk tiġi eliminata l-ħtieġa li jitkejjel il-piż ta' "imbjank tal-melħ". Din l-informazzjoni tintuża biex tikkonverti l-informazzjoni fit-Tabella minn piż xott tal-gamblu tal-ilma mielaħ għall-volum tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ li jrid jintema' lil kull ħuta. Barra minn hekk, hu rakkomandat li l-alikwoti tas-sospensjoni magħquda tal-gamblu tal-ilma mielaħ jintiżnu ta' kull ġimgħa biex jiġi verifikat il-piż xott korrett tal-gamblu tal-ilma mielaħ magħluf.

Tabella 1: Eżempju ta' skeda tat-taghlif

Żmien (wara t-tifqis)	Gamblu tal-Ilma Mielah (mg piż xott/huta/jum)
Jum 1	0,5
Jum 2	0,5
Jum 3	0,6
Jum 4	0,7
Jum 5	0,8
Jum 6	1,0
Jum 7	1,3
Jum 8	1,7
Jum 9	2,2
Jum 10	2,8
Jum 11	3,5
Jum 12	4,2
Jum 13	4,5
Jum 14	4,8
Jum 15	5,2
Jum 16-21	5,6
Ġimgħa 4	7,7
Ġimgħa 5	9,0
Ġimgħa 6	11,0
Ġimgħa 7	13,5
Ġimgħa 8-sagrificċju	22,5

Appendiċi 6

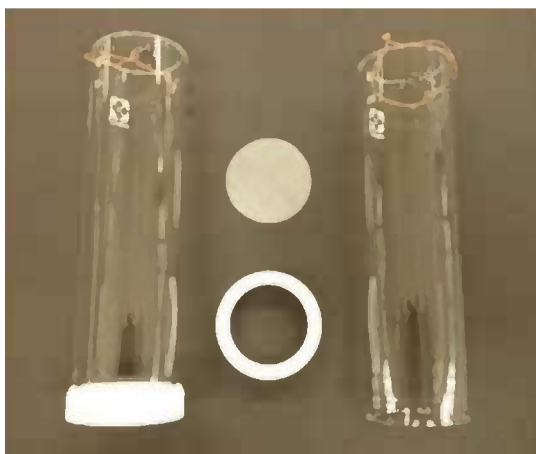
EŻEMPJI TA' KOMPARTIMENT TA' INKUBAZZJONI TAL-BAJD

Eżempju A



Dan l-inkubatur jikkonsisti f'tubu ċentrifugu tal-ħġieġ transettat, konness b'pajp tal-azzar inossidabbli u miżmum f'postu bit-tapp tal-kamin ċentrifugu. Tubu żgħir tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli jipproġetta minn ġot-tapp u jitqiegħed qrib il-qiegħ ittondjat, filwaqt li jiffirma b'żiežaq tal-arja bil-galbu biex jissospendi l-bajd u jnaqqas it-trażmissjoni bejn il-bajd ta' infezzjonijiet fungali saprofitiċi filwaqt li jiffacilita wkoll l-iskambju ta' sustanzi kimiċi bejn l-inkubatur u t-tank kontenitur.

Eżempju B



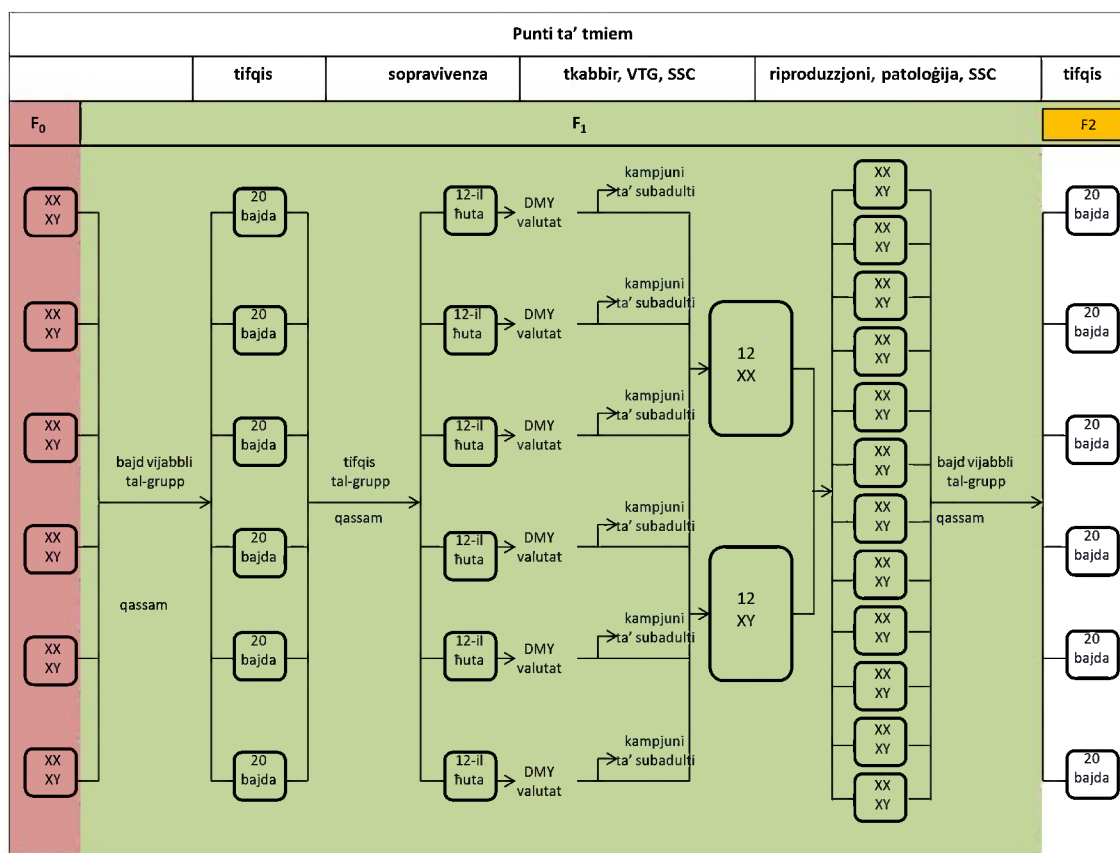


Dan l-inkubatur jikkonsisti f'korp ċilindriku tal-ħġiegħ (dijametru ta' 5 cm u għoli ta' 10 cm) u xibka tal-wajer inossidabbli (xibka ta' 0,25 ϕ u 32) li titqabbad mal-qiegħ tal-korp b'ċirku PTFE. L-inkubaturi jiġu sospizi mill-iżbarra tal-irfiġħ għat-tankijiet, u jithezžu vertikalment (amplitudni ta' madwar 5 cm) f'ċiklu xieraq (bejn wieħed u ieħor darba kull 4 sekondi) għall-bajd tal-medaka.

Appendiċi 7

DIJAGRAMMA SKEMATIKA GĦAR-RAGGRUPPAR U GĦALL-POPOLAMENT TAR-REPLIKI FI HDAN IL-METODU TA' TTESTJAR MEOGRT

Figura 1: Ir-raggruppament u r-ripopolament tar-repliki fi hdan l-MEOGRT. Il-figura tirrappreżenta trattament wiehed jew nofs ta' kontroll. Minhabba r-raggruppament, l-identità tar-repliki mhix kontinwa matul it-test. Kun af li t-terminu "bajd" jirreferi għal bajd vijabbli fertilizzati (ekwivalenti għal embrijuni).



Trattamenti u Replika.

Il-metodu ta' ttestjar jirrakkomanda hames trattamenti tas-sustanza kimika tat-test li jużaw materjal ta' grad tekniku u kontroll negattiv. In-numru ta' repliki għal kull trattament ma jibqax kostanti matul l-MEOGRT, u n-numru ta' repliki fit-trattament tal-kontroll hu d-doppju ta' kwalunkwe trattament uniku bis-sustanza kimika tat-test. F'F₀, kull trattament bis-sustanza kimika tat-test ikollu sitt repliki filwaqt li t-trattament bil-kontroll negattiv ikollu 12-il replika. Is-solventi huma ferm skoragguti, u jekk jintużaw, fir-rapport tal-MEOGRT għandha tiġi inkluża ġustifikazzjoni kemm għall-użu ta' solvent kif ukoll għall-għażla tas-solvent. Barra minn hekk, jekk jintuża solvent, ikun hemm bżonn ta' żewġ tipi ta' kontroll: a) kontroll b'solvent, u b) kontroll negattiv. Dawn iż-żewġ gruppi ta' kontroll ilkoll għandhom jikkonsistu f'komplement shih ta' repliki fil-punti kollha fi hdan l-iskeda ta'

żmien tal-MEOGRT. Matul l-iżvilupp kollu tal-organizmi tat-test fil-generazzjoni F1 (u F2, sat-tifqis), din l-istruttura tar-repliki tibqa' l-istess. Madankollu, fl-istadju adult meta jigu fformati l-pari tat-tgħammir tal-F1, in-numru ta' repliki ta' pari tar-riproduzzjoni għal kull trattament jiġi rdoppjat b'mod ottimali; għaldaqstant, ikun hemm sa 12-il par ta' repliki f'kull trattament bis-sustanza kimika tat-test u 24 par ta' repliki fil-grupp tal-kontroll (u 24 par ta' repliki oħra fil-kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn). Id-determinazzjoni tat-tifqis mill-embrijuni riprodotti mill-pari tal-F1 issir bl-istess struttura ta' repliki kif saret għall-embrijuni riprodotti mill-pari tal-F0, jiġifieri inizjalment sitt repliki għal kull trattament bis-sustanza kimika tat-test u 12-il replika fil-grupp(i) tal-kontroll.

Appendiċi 8

GHADD TAL-PAPILLI TAL-PINEN ANALI

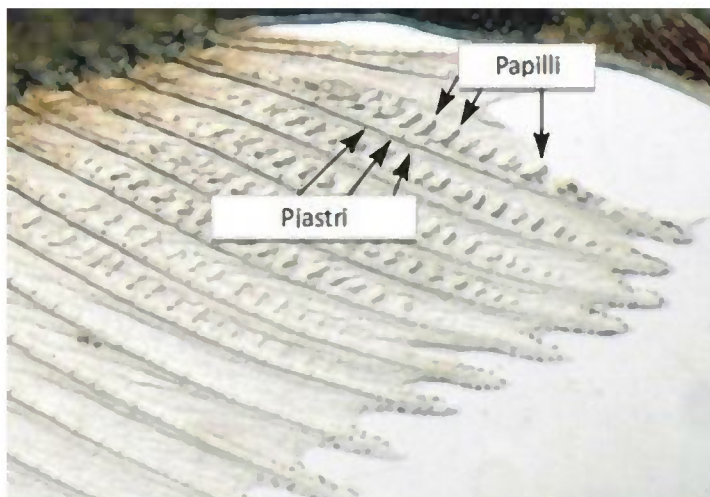
Materjali u Reagenti Ewlenin

- Mikroskopju għad-dissezzjoni (b'kamera mqabbda fakultattiva)
- Fissattiv (eż. ta' Davidson (ta' Bouin mhuwiex rakkomandat)), jekk ma jingħaddux mill-immagni

Proċeduri

Wara n-nekroskopija, għandha tittiehed immagni tal-pinna anali għall-għadd konvenjenti tal-papilli tal-pinen anali. Filwaqt li t-tehid ta' immagnijiet hu l-metodu rakkomandat, il-pinna anali tista' tiġi ffixxata b'fissattiv ta' Davidson jew b'fissattiv xieraq ieħor għal madwar minuta (1). Importanti li l-pinna anali tinżamm ċatta matul il-fissazzjoni biex il-papilli jkunu jistgħu jingħaddu aktar faċilment. Il-karkassa bil-pinna anali tista' tinħażen f'fissattiv ta' Davidson jew f'fissattiv xieraq ieħor sakemm tiġi analizzata. Ghodd in-numru ta' pjastri kongunti (ara l-**Figura 1**) bil-papilli li jinfdu mill-margni ta' wara tal-pjastra kongunta.

Figura 1: Papilli tal-pinna anali



Appendiċi 9

SKEDA TA' ŻMIEN DETTALJATA TAL-MEOGRT

Ġimghat tat-Test 1-3 (F0)

Il-ħut tal-generazzjoni tal-F0 li jirriproduċi u li jissodisfa l-kriterji tal-ghażla (ara l-para. 16-20) jiġi espost għal tliet ġimghat biex il-gameti fl-iżvilupp u t-tessuti gonadali jkunu esposti għas-sustanza kimika tat-test. Kull tank ta' repliki jospita par wieħed ta' ħut tat-tgħammir (par tat-tgħammir ta' mara XX u ta' raġel XY). Il-bajd riprodott jingabar, jingħadd u jiġi vvalutat għall-fertilità għal 21 jum konsekuttiv, b'bidu fil-Jum 1 tat-Test.

Ġimgha 4 tat-Test (F0 u F1)

Idealment il-bajd fertilizzat u vijabbli (embrijuni) jingabar f'jum wieħed; madankollu, jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni, l-embrijuni jistgħu jingabru fuq jumejn. Jekk jingabru wara jumejn, l-embrijuni kollha fi ħdan it-trattamenti li jkunu ngabru fl-ewwel jum jiġu raggruppati ma' daww miġbura fit-tieni jum. Imbagħad, l-embrijuni raggruppati totali għal kull trattament jiġu distribwiti b'mod aleatorju f'kull wieħed mill-inkubaturi ta' repliki f'20 embrijun għal kull inkubatur. Il-mortalitajiet tal-bajd fertilizzat (embrijuni) jiġu verifikati u reġistrati ta' kuljum. Il-bajd mejjet jitneħħa mill-inkubaturi (mewt f'bijd fertilizzat jista' jiġi denotat, b'mod partikolari fl-istadji bikrin, b'telf notevoli ta' translucenza u tibdil fil-kulur, ikkawżat minn koagulazzjoni u/jew preċipitazzjoni tal-proteina, li jwasslu għal dehra opaka bajda; OECD 210).

Nota: Jekk trattament wieħed ikun jehtieg it-tieni jum ta' ġbir, it-trattamenti kollha (inklużi l-kontrolli) iridu jsegwu din il-proċedura. Jekk wara t-tieni jum tal-ġbir ikun hemm numri inadegwati ta' embrijuni fi ħdan trattament biex jitgħabbew 20 embrijun għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' embrijuni mgħobbija fi ħdan dak it-trattament speċifiku għal 15-il embrijun għal kull inkubatur. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni biex jitgħabbew 15 għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' inkubaturi ta' repliki sakemm ikun hemm biżżejjed embrijuni għal 15 għal kull inkubatur. Barra minn hekk, jistgħu jiżdiedu aktar pari tat-tgħammir għal kull trattament u jistgħu jiżdiedu l-kontrolli f'F0 biex jipproduċu aktar bajd bl-ghan li jintlaħqu l-20 rakkomandati għal kull replika.

Fil-Jum 24 tat-Test, il-pari tat-tgħammir F0 jinqatlu bl-ewtanażja u jittiehed rekord tal-piż u tat-tul. Jekk ikun hemm bżonn, il-pari tat-tgħammir F0 jistgħu jinżammu għal jum/jumejn addizzjonali biex terġa' tinbeda l-F1.

Ġimghat tat-Test 5-6 (F1)

Jum sa jumejn qabel il-bidu antiċipat tat-tifqis, waqqaf jew naqqas l-aġitazzjoni tal-bajd tal-inkubazzjoni biex thaffef it-tifqis. Peress li l-embrijuni jfaqqsu f'kull jum, l-imfaqqsa jiġu raggruppati skont it-trattament u jitqassmu b'mod sistematiku f'kull tank tal-larva ta' repliki fi ħdan trattament speċifiku b'mhux aktar minn 12-il imfaqqas. Dan isir bl-ghażla aleatorja tal-imfaqqsa u bit-tqegħid ta' mfaqqas wieħed f'repliki suċċessivi fi grupp indiskriminat, bi

proċedimenti skont l-ordni fir-repliki ta' trattament speċifiċi sakemm ir-repliki kollha fi ħdan it-trattament ikollhom 12-il imfaqqas. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed imfaqqas biex jimtlew ir-repliki kollha, ara li l-akbar numru possibbli ta' repliki jkollhom 12-il imfaqqas biex jibdwew il-faġi F1.

Il-bajd li ma jkunx għadu faqqas sad-doppju tal-jum medjan tal-kontroll jitqies mhux vijabbli u jintrema. In-numru ta' mfaqqas jiġi registrat u s-suċċess tat-tifqis (il-kapaċità ta' tifqis) jiġi kkalkolat f'kull replika.

Ġimghat tat-Test 7-11 (F1)

Is-sopravivenza ta' ħut larvali tiġi verifikata u registrata kuljum fir-repliki kollha. Fil-Jum 43 tat-Test, in-numru ta' ħut li jkun għadu ħaj f'kull replika jiġi registrat kif ukoll in-numru tinizjali ta' mfaqqas mqiegħda fir-replika (normalment tnax). Dan jippermetti għall-kalkolu tas-sopravivenza perċentwali mit-tifqis sal-istadju subadult.

Ġimghat tat-Test (F1)

Fil-Jiem 78-85 tat-Test, jittiehed kampjun żgħir mill-pinna tad-denb ta' kull ħuta biex jiġi determinat is-sess ġenotipiku tal-individwu (jiġifieri qtugħ tal-pinna) għall-ħut kollu. Din l-informazzjoni tintuża biex jiġu stabbiliti l-pari tat-tgħammir.

Fi żmien tliet ijiem wara li jiġi determinat is-sess ġenotipiku ta' kull ħuta, jiġu stabbiliti b'mod aleatorju 12-il par tat-tgħammir għal kull trattament u 24 par għal kull kontroll. Żewġ ħutiet XX u XY minn kull replika jintgħażlu b'mod aleatorju u mbagħad jiġu raggruppati skont is-sess, u mbagħad jintgħażlu b'mod aleatorju biex jistabbilixxu par tat-tgħammir (jiġifieri par XX-XY). Tal-anqas jiġu stabbiliti 12-il replika għal kull trattament kimiku u tal-anqas 24 replika għall-kontroll b'par tat-tgħammir wieħed għal kull replika. Jekk replika ma jkollhiex żewġ ħutiet XX jew żewġ ħutiet XY disponibbli għar-raggruppament, għandu jinkiseb il-ħut bil-ġenotip tal-ġeneru xieraq minn repliki oħra fi ħdan it-trattament.

Il-ħut li jifdal (massimu ta' tmien ħutiet għal kull replika) jinqatel bl-ewtanażja u jittiehed kampjun tiegħu għad-diversi punti ta' tmiem subadult. Id-*data* tad-*dmy* (XX jew XY) għall-kampjuni subadulti kollha tinżamm biex jiġi żgurat li d-*data* tal-punti ta' tmiem kollha tkun tista' tiġi relatata mas-sess ġenetiku ta' kull ħuta individwali.

Ġimghat tat-Test 13-14 (F1)

L-esponiment ikompli hekk kif il-pari ta' tgħammir ta' subadulti jiżviluppaw f'adulti. Fil-Jum 98 tat-Test (jiġifieri l-jum qabel ma jinbeda l-ġbir tal-bajd), il-bajd jitneħħa kemm mill-akkwarji kif ukoll min-nisa.

Ġimghat tat-Test 15-17 (F1)

Il-bajd riprodott jingabar ta' kuljum għal 21 jum konsekuttiv f'kull replika, u jiġi vvalutat għall-fekondità u għall-fertilità.

Ġimgha 18 tat-Test (ripetizzjoni tal-Ġimgha 4 tat-Test) (F1 u F2)

Fil-Jum 120 tat-Test, il-ġbir tal-bajd isir f'kull tank ta' repliki filgħodu. Il-bajd miġbur jiġi vvalutat u l-bajd fertilizzat (filamenti mneħħija) minn kull wieħed mill-pari tat-tgħammir jiġi raggruppat skont it-trattament, jitqassam b'mod sistematiku fil-kompartimenti ta' inkubazzjoni tal-bajd b'20 bajda fertilizzata għal kull inkubatur. L-inkubaturi jistgħu jitqiegħdu f'"tankijiet inkubaturi" separati stabbiliti għal kull trattament jew fit-tank ta' repliki li mat-tifqis se jkun fih il-larva mfaqqsa. Idealment l-embrijuni jingabru f'jum wieħed; madankollu, jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni, l-embrijuni jistgħu jingabru fuq jumejn. Jekk jingabru wara jumejn, l-embrijuni kollha fi hdan it-trattamenti li jkunu ngabru fl-ewwel jum jiġu raggruppati ma' daww miġbura fit-tieni jum. Imbagħad, l-embrijuni raggruppati totali għal kull trattament jiġu distribwiti b'mod aleatorju f'kull wieħed mill-inkubaturi ta' repliki f'20 embrijun għal kull inkubatur. Nota: Jekk trattament wieħed ikun jeħtieġ it-tieni jum ta' ġbir, it-trattamenti kollha (inklużi l-kontrolli) iridu jsegwu din il-proċedura. Jekk wara t-tieni jum tal-ġbir ikun hemm numri inadegwati ta' embrijuni fi hdan trattament biex jitgħabbew 20 embrijun għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' embrijuni mgħobbija fi hdan dak it-trattament speċifiku għal 15-il embrijun għal kull inkubatur. Jekk ma jkunx hemm biżżejjed embrijuni biex jitgħabbew 15 għal kull inkubatur, naqqas in-numru ta' inkubaturi ta' repliki sakemm ikun hemm biżżejjed embrijuni għal 15 għal kull inkubatur.

Fil-Jum 121 tat-Test (jew fil-Jum 122 tat-Test, biex tiżgura li l-F2 bdiet sew), il-pari tat-tgħammir tal-F1 jinqatlu bl-ewwtanażja u jiġu analizzati għall-punti ta' tmiem tal-adulti. Jekk ikun hemm bżonn, il-pari tat-tgħammir F1 jistgħu jinżammu għal jum/jumejn addizzjonali biex terġa' tinbeda l-F2.

Ġimghat tat-Test 19-20 (F2)

Jum sa jumejn qabel il-bidu antiċipat tat-tifqis, waqqaf jew naqqas l-aġitazzjoni tal-bajd tal-inkubazzjoni biex thaffef it-tifqis. Jekk it-test jiġi terminat bit-tlestija tat-tifqis tal-F2, kull jum l-imfaqqsa jingħaddu u jintremew. (L-embrijuni li ma jkunux għadhom faqqsu wara żmien twil ta' inkubazzjoni, definit bħala d-doppju tal-jum medjan tal-kontroll tat-tifqis, jitqiesu mhux vijabbli).

Appendiċi 10

ANALIŻI STATISTIKA

It-tipi ta' *data* bijoloġika generata fl-MEOGRT mhumie x uniċi għalih u hlief għad-*data* dwar il-patoloġija, ġew żviluppati hafna metodoloġiji statistiċi xierqa biex tiġi analizzata *data* simili skont il-karatteristiċi tad-*data* inklużi n-normalità, l-omoġenità tal-varjanza, jekk id-disinn tal-istudju jistax jiġi soġġett għall-ittestjar tal-ipoteżi jew għall-analiżi tar-rigressjoni, għal testijiet parametriċi kontra testijiet mhux parametriċi, eċċ. Bħala prinċipju ġenerali, l-analiżijiet statistiċi suġġeriti jsegwu r-rakkomandazzjonijiet tal-OECD għad-*data* dwar l-ekotossicità (OECD 2006) u fil-Figura 2 hi pprovduta flowchart tad-deċiżjonijiet għall-analiżi tad-*data* tal-MEOGRT.

Hu supponut li spiss, is-settijiet ta' *data* juru risponsi monotoniċi. Barra minn hekk, għandha tiġi kkunsidrata l-kwistjoni ta' użu ta' test statistiku b'denb wiehied kontra test statistiku b'żewġ idnub. Sakemm ma jkunx hemm raġunament bijoloġiku li jagħmel test b'denb wiehied inadatt, hu suġġerit li jintużaw testijiet b'denb wiehied. Filwaqt li t-taqsima li ġejja tirrakkomanda ċerti testijiet statistiċi, jekk jiġu żviluppati metodi statistiċi aktar xierqa u/jew b'saħħithom għall-applikazzjoni għad-*data* speċifika generata fl-MEOGRT, daww it-testijiet statistiċi jintużaw biex jingranaw daww il-vantaġġi.

Id-*data* tal-MEOGRT għandha tiġi analizzata b'mod separat għal kull sess ġenotipiku. Hemm żewġ strateġiji biex tiġi analizzata d-*data* mill-ħut b'sess imdawwar (irġiel XX jew nisa XY). 1) Tiċċensura d-*data* kollha minn ħut b'sess imdawwar fit-test kollu hlief il-prevalenza tat-tidwir tas-sess f'kull replika. 2) Thalli d-*data* mil-ħut kollu b'sess imdawwar fis-sett ta' *data* u tanalizza fuq il-bażi tal-ġenotip.

Data tal-istopatoloġija

Id-*data* tal-istopatoloġija tiġi rapportata bħala punteġġi tas-severità li jiġu evalwati bl-użu ta' proċedura statistika żviluppata ġdida, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS), (Green *et al.*, 2014). L-aġġustament Rao-Scott iżomm l-informazzjoni dwar ir-replika tat-test; il-proċedura by Slices tinkorpora l-aspettattiva bijoloġika li l-punteġġi tas-severità għandhom tendenza li jiżdiedu aktar ma jiżdiedu l-konċentrazzjonijiet tat-trattament. Għal kull djanjożi, l-eżitu tal-RSCABS jispeċifika liema trattamenti għandhom prevalenza oġhla tal-patoloġija mill-kontrolli u l-livell ta' severità assoċjat.

Data dwar il-fekondità

L-analiżijiet għad-*data* dwar il-fekondità jikkonsistu f'test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra jew ta' Williams biex jiġu determinati l-effetti tat-trattament, dment li d-*data* tkun konsistenti ma' rispons monotonu għall-konċentrazzjoni. B'test ta' tendenza ta' rigressjoni, kull tqabbil isir fil-livell ta' sinifikat ta' 0,05 u ma jsir ebda aġġustament għan-numru ta' paraguni. Id-*data* hi mistennija tkun konsistenti ma' rispons monotonu għall-konċentrazzjoni, iżda din tista' tiġi verifikata jew bi spezzjoni viżwali tad-*data* jew bil-bini ta' kuntrasti lineari u kwadratiċi tal-medji tat-trattament wara trasformazzjoni tal-ordni tal-

klassifikazzjonijiet tad-*data*. Hlief jekk il-kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx sinifikanti, isir it-test ta' tendenza. Inkella, jintuża t-test ta' Dunnett biex jiġu determinati l-effetti tat-trattament jekk id-*data* tiġi distribwita b'mod normali b'varjanzi omoġeni. Jekk daww ir-rekwiżiti ma jiġux issodisfati, jintuża t-test ta' Dunn b'agġustament ta' Bonferonni-Holm. It-testijiet indikati kollha jsiru b'mod indipendenti minn kwalunkwe test ġenerali F jew ta' Kruskal-Wallis. Aktar dettalji huma pprovduti f'OECD 2006.

Jistgħu jintużaw metodi alternattivi, bħal mudell lineari ġeneralizzat b'erruri ta' Poisson għall-ġhadd tal-bajd (b'ebda transformazzjoni), jekk dawn ikunu statistikament ġustifikati (Cameron u Trividi, 2013). Hu rakkomandat parir statistiku jekk jintuża approċċ alternattiv.

Għadd tal-Bajd ta' Kuljum fi ħdan Ġenerazzjoni Wahda

Il-mudell ANOVA jingħata b' $Y = \text{Žmien} * \text{Žmien} + \text{Trattament} + * \text{Trattament} + \text{Žmien} * \text{Trattament} + * \text{Žmien} * \text{Trattament}$, b'effetti aleatorji tar-Replika(Ġenerazzjoni*Trattament), u $\text{Žmien} * \text{Replika}(\text{Trattament})$, biex ikun jista' jkun hemm komponenti ta' varjanza mhux indaqs taż-żewġ tipi fost il-ġenerazzjonijiet. Hawnhekk Žmien tirreferi għall-frekwenza tal-ġhadd tal-bajd (eż., Jum jew Ġimgħa). Din hi analiżi b'kejljiet ripetuti, bil-korrelazzjonijiet bejn l-osservazzjonijiet fl-istess repliki li jirrapprezentaw in-natura ta' kejljiet ripetuti tad-*data*.

L-effetti ewlenin tat-trattament jiġu ttestjati bl-użu tat-test ta' Dunnett (jew Dunnett-Hsu), li jaġġusta għan-numru ta' paraguni. L-agġustamenti għall-effett ewlieni tal-ġenerazzjoni jew tal-ħin huma meħtieġa, peress li b'dawn iż-żewġ fatturi, ma hemm ebda livell ta' "kontroll" u kull par ta' livelli hu paragon ta' interess possibbli. Għal dawn iż-żewġ effetti ewlenin, jekk it-test-F għall-effett ewlieni jkun sinifikanti fil-livell 0,05, il-paraguni bejn il-pari fil-livelli ta' dak il-fattur ikunu jistgħu jiġu ttestjati fil-livell ta' 0,05 mingħajr agġustament ulterjuri.

Il-mudell jinkludi interazzjonijiet ta' żewġ u ta' tliet fatturi, biex effett ewlieni għal, pereżempju, žmien , ma jkunx jista' jkun sinifikanti, anki jekk iż- žmien ikollu impatt sinifikanti fuq ir-riżultati. B'hekk, jekk interazzjoni ta' żewġ jew ta' tliet fatturi li tinvolvi žmien tkun sinifikanti fil-livell ta' 0,05, wieħed jista' jaċċetta l-paraguni tal-livelli tal-ħin fil-livell ta' sinifikat ta' 0,05 mingħajr agġustament ulterjuri.

Imbagħad ikun imiss it-testijiet-F għas-sinifikat tat-trattament fi ħdan iż- žmien , l-hekk imsejja slices fit-tabella ta' ANOVA. Jekk, pereżempju, is-slice għat-trattament fi ħdan F1 u žmien 12, ikun sinifikanti fil-livell ta' 0,05, il-paraguni bejn il-pari għat-trattament fi ħdan F1 u žmien 12 jistgħu jiġu aċċettati fil-livell ta' 0,05 mingħajr agġustament ulterjuri. Japplikaw dikjarazzjonijiet simili għal testijiet għaž- žmien fi ħdan l-F1 u t-trattament u għall-ġenerazzjoni fi ħdan žmien u trattament.

Finalment, għall-paraguni li ma jaqgħux taħt xi waħda mill-kategoriji msemmiha hawn fuq, il-paraguni għandhom ikunu agġustati bl-użu tal-agġustamenti ta' Bonferroni-Holm għall-valuri-p. Informazzjoni ulterjuri dwar l-analiżijiet tat-tali mudelli tista' tinstab f'Hocking (1985) u f'Hochberg u Tamhane (1987).

Inkella, id-*data* mhux proċessata tiġi reġistrata u ppreżentata fir-rapport tal-istudju bħala l-fekondità (numru ta' bajd) għal kull replika għal kull jum. Għandha tiġi kkalkolata l-medja tar-repliki tad-*data* mhux proċessata u mbagħad għandha tiġi applikata trasformazzjoni bl-għerq kwadrat. ANOVA f'direzzjoni waħda dwar il-medji tar-repliki trasformati għandha tiġi kkalkolata segwita mill-kuntrasti ta' Dunnett. Jista' jkun siewi wkoll li ssir spezzjoni viżwali tad-*data* dwar il-fekondità ta' kull trattament u/jew replika bi scatterplot li turi d-*data* maż-żmien. Din tippermetti li ssir valutazzjoni informali tal-effetti potenzjali maż-żmien.

Id-*data* bijoloġika l-oħra kollha

L-analizjiet statistiċi huma bbażati fuq is-suppożizzjoni sottostanti li bl-għażla tad-doża xierqa, id-*data* tkun monotonika. B'hekk, id-*data* tiġi supponuta monotonika u tiġi evalwata b'mod formali għall-monotoniċità bl-użu ta' kuntrasti lineari u kwadratiċi. Jekk id-*data* tkun monotonika, hu rakkomandat li jsir test ta' tendenzi tal-medjani tar-repliki ta' Jonckheere-Terpstra (kif rakkomandat f'OECD 2006). Jekk il-kuntrast kwadratiku jkun sinifikanti u l-kuntrast lineari ma jkunx, id-*data* titqies mhux monotonika.

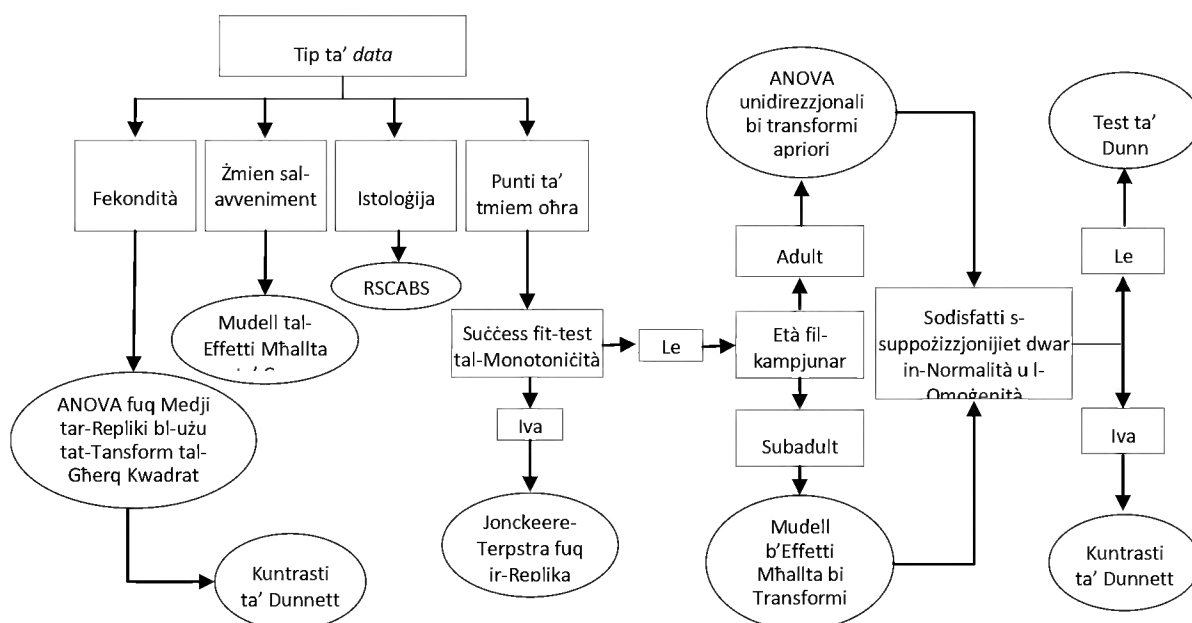
Jekk id-*data* ma tkunx monotonika, b'mod partikolari minhabba r-rispons imnaqqas tal-ogħla trattament jew tal-ogħla żewġ trattamenti, għandha tingħata kunsiderazzjoni liċ-ċensura tas-sett ta' *data* biex l-analiżi ssir mingħajr dawk it-trattamenti. Din id-deċiżjoni jkollha ssir b'gudizzju professjonali u bid-*data* disponibbli kollha, speċjalment id-*data* li tindika tossiċità ċara f'dawk il-livelli ta' trattament.

Għall-piż u għat-tul, ma hi rakkomandata ebda trasformazzjoni għalkemm din kultant tista' tkun neċessarja. Madankollu, trasformazzjoni tal-log hi rakkomandata għad-*data* dwar il-vitellogenina; trasformazzjoni bl-għerq kwadrat hi rakkomandata għad-*data* dwar l-SSC (papilli tal-pinen anali); trasformazzjoni bl-għerq kwadrat arcsine hi rakkomandata għad-*data* dwar it-tifqis ta' proporzjon, għas-sopravivenza perċentwali, għall-proporzjon tas-sess, u għall-perċentwal tal-bajd fertili. Iz-żmien sat-tifqis u ż-żmien sal-ewwel riproduzzjoni għandhom jiġu trattati bħala *data* taż-żmien sa avveniment, bl-embrijuni individwali li ma jfaqqsx fil-perjodu definit jew bir-repliki li qatt ma jirriproduċu li jiġu trattati bħala *data* "right-censored". Iz-żmien sat-tifqis għandu jiġi kkalkolat mill-jum medjan tat-tifqis ta' kull replika. Dawn il-punti ta' tmiem għandhom jiġu analizzati bl-użu tal-mudell ta' periklu proporzjonali ta' Cox b'effetti mħallta.

Id-*data* bijoloġika minn kampjuni ta' adulti jkollha kejl wieħed għal kull replika, jiġifieri, jkun hemm ħuta XX waħda u ħuta XY waħda għal kull akkwarju tar-repliki. Għaldaqstant, hu rakkomandat li ssir ANOVA f'riezzjoni waħda fuq il-medji tar-repliki. Jekk jiġu ssodisfati s-suppożizzjonijiet tal-ANOVA (normalità u omogenità tal-varjanza kif valutati fuq ir-residwi tal-ANOVA bit-test ta' Sapiro-Wilks u bit-test ta' Levene, rispettivament), il-kuntrasti ta' Dunnett għandhom jintużaw biex jiġu determinati trattamenti li kienu differenti mill-kontroll. Min-naħa l-oħra, jekk is-suppożizzjonijiet tal-ANOVA ma jiġux issodisfati, għandu jsir test ta' Dunn biex jiġi determinat liema trattamenti kienu differenti mill-kontroll. Hi rakkomandata proċedura simili għal *data* li tkun fil-forma ta' perċentwali (fertilità, tifqis u sopravivenza).

Id-*data* bijoloġika minn kampjuni ta' subadulti għandha minn kejl sa tmien kejljiet għal kull replika, jiġifieri, jista' jkun hemm numru varjabbli ta' individwi li jikkontribwixu għall-medja ta' repliki għal kull sess ġenotipiku. Għaldaqstant, hu rakkomandat li jintuża mudell tal-ANOVA b'effetti mhallta segwit minn kuntrasti ta' Dunnett, jekk jiġu ssodisfati s-suppożizzjonijiet dwar in-normalità u l-omoġenità tal-varjanza (fuq ir-residwi tal-ANOVA b'effetti mhallta). Jekk is-suppożizzjonijiet tal-ANOVA ma jiġux issodisfati, għandu jsir test ta' Dunn biex jiġi determinat liema trattamenti kienu differenti mill-kontroll.

Figura 2: Flow chart għall-proċeduri statistiċi rakkomandati għall-analiżi tad-*data* tal-MEOGRT.



Dokumentazzjoni

- (1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.
- (2) Cameron AC u Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.
- (3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y u Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

C.53 L-ASSAĠĠ TAT-TKABBIR U TAL-IŻVILUPP TAL-ANFIBJI LARVALI (LADGA)

INTRODUZZJONI

1. Dan il-metodu ta' ttestjar hu ekwivalenti għal-linja gwida tat-test 241 (2015) tal-OECD. Il-htieġa ta' żvilupp u ta' validazzjoni ta' assaġġ li kapaċi jidentifika u jikkarakterizza l-konsegwenzi avversi tal-esponiment għal sustanzi kimiċi tossiċi fl-anfibji ġejja mit-tħassib li l-livelli ambjentali tas-sustanzi kimiċi jistgħu jikkawgħaw effetti avversi kemm fuq il-bniedem kif ukoll fuq l-organizmi selvaġġi. Il-linja gwida tat-test tal-OECD tal-Assaġġ tat-Tkabbir u tal-Iżvilupp tal-Anfibji Larvali (LAGDA) tiddekrivi test tat-tossiċità bi speċi anfibja li jkollha it-tkabbir u l-iżvilupp mill-fertilizzazzjoni sal-perjodu bikri meta l-ħut ikun għadu żgħir. Hu assaġġ (tipikament ta' 16-il ġimgħa) li jivvaluta l-iżvilupp bikri, il-metamorfosi, is-sopravivenza, it-tkabbir u l-maturazzjoni riproduttiva parzjali. Jippermetti wkoll il-kejl ta' sensiela ta' punti ta' tmiem oħra li jippermetti li ssir evalwazzjoni djanjostika ta' sustanzi kimiċi interferenti endokrinali (EDCs) suspettati jew ta' tipi oħra ta' tossikanti għall-iżvilupp u għar-riproduzzjoni. Il-metodu deskritt f'dan il-metodu ta' ttestjar hu derivat mill-ħidma ta' validazzjoni fuq iż-żring Afrikan bil-qawqba (*Xenopus laevis*) mill-U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) b'ħidma ta' sostenn fil-Ġappun (1). Għalkemm l-ispeċi anfibja tista' tiġi adattata għal protokoll tat-test tat-tkabbir u tal-iżvilupp bil-ħila li jiddetermina s-sess ġenetiku li hi komponent importanti, il-metodi speċifiċi u l-punti ta' tmiem osservazzjonali spjegati f'dan il-metodu ta' ttestjar huma applikabbli għall-*Xenopus laevis* biss.
2. Il-LAGDA jservi bħala test ta' livell oghla b'anfibju għall-ġbir ta' informazzjoni aktar komprensiva dwar ir-rispons għall-konċentrazzjoni dwar l-effetti avversi xierqa għall-użu fl-identifikazzjoni u fil-karakterizzazzjoni tal-perikli, u f'valutazzjoni tar-riskju ekoloġiku. L-assaġġ joqgħod fil-Livell 4 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali, fejn l-assaġġi *in vivo* jipprovdi *data* dwar l-effetti avversi fuq il-punti ta' tmiem endokrinali rilevanti (2). Id-disinn ġenerali tal-esperiment jinvolvi l-esponiment tal-embrijuni ta' *X. laevis* fl-istadju 8-10 ta' Nieuwkoop u Faber (NF) (3) għal minimu ta' erba' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test (ġeneralment imqassma f'intervalli mhux anqas minn nofs logaritmiki) u kontroll(i) sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 tal-NF fil-kontroll, b'subkampjun interim wieħed fl-istadju 62 tal-NF (≤ 45 wara l-fertilizzazzjoni; normalment madwar 45 jum (dpf). Hemm erba' repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test bi tmien repliki għall-kontroll. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment (fis-subkampjun interim u fil-kampjun finali mat-tlestija tat-test) jinkludu dawk indikattivi ta' tossiċità ġeneralizzata: il-mortalità, l-imġiba anormali, u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (it-tul u l-piż) kif ukoll il-punti ta' tmiem imfassla biex jikkarakterizzaw modalitajiet ta' azzjoni speċifiċi dwar it-tossiċità

endokrinali mmirati lejn il-proċessi fiżjoloġiċi medjati bl-estrogenu, bl-androgenu jew bit-tirojde. Il-metodu jixhet enfasi primarja fuq l-effetti potenzjali rilevanti għall-popolazzjoni (jiġifieri l-impatti avversi fuq is-sopravivenza, l-iżvilupp, it-tkabbir u l-iżvilupp riproduttiv) għall-kalkolu ta' Konċentrazzjoni Bla Effett Osservat (NOEC) jew Konċentrazzjoni b'Effett li tikkawża tibdil ta' $x\%$ (EC_x) fil-punt ta' tmiem imkejje. Għalkemm ta' min jinnota li l-approċċ tal-EC_x rarament ikunu xierqa għal studji kbar ta' dan it-tip fejn iż-żieda tan-numru tal-konċentrazzjonijiet tat-test biex tkun tista' tiġi determinata l-EC_x mixtieqa tista' tkun imprattika. Ta' min jinnota li l-metodu ma jkoprix il-fażi riproduttiva nfisha. Id-definizzjonijiet użati f'dan il-metodu ta' ttestjar jingħataw fl-Appendiċi 1.

KUNSIDERAZZJONIJIET INIZJALI U LIMITAZZJONIJIET

3. Minhabba n-numru limitat ta' sustanzi kimiċi ttestjati u ta' laboratorji involuti fil-validazzjoni ta' dan l-assaġġ kemxejn kumpless, speċjalment minhabba li r-riproduċibbiltà interlaboratorja mhix dokumentata b'*data* sperimentali s'issa, hu antiċipat li la jkun hemm numru suffiċjenti ta' studji disponibbli biex jiġi żgurat l-impatt ta' dan id-disinn il-ġdid tal-istudju, il-linja gwida tat-test 241 tal-OECD se tiġi rieżaminata u, jekk ikun hemm bżonn, riveduta, fid-dawl tal-esperjenza miksuba. Il-LAGDA hu assaġġ importanti biex jiġu indirizzati l-kontributuri importanti għat-tnaqqis fil-popolazzjoni anfibi bl-evalwazzjoni tal-effetti mill-esponiment għal sustanzi kimiċi matul l-istadju larvali sensitiv, fejn l-effetti fuq is-sopravivenza u l-iżvilupp, inkluż l-iżvilupp normali tal-organi riproduttivi, jistgħu jaffettwaw il-popolazzjonijiet b'mod avvers.
4. It-test hu mfassal biex jindividwa effett(i) apiċi li jirriżultaw kemm minn mekkaniżmi endokrinali kif ukoll minn dawk mhux endokrinali, u jinkludi punti ta' tmiem djanjostiċi li huma parzjalment speċifiċi għal modalitajiet endokrinali ewlenin. Ta' min jinnota li sakemm ġie żviluppat il-LAGDA, ma kien jeżisti ebda assaġġ validat li jservi din il-funzjoni għall-anfibji.
5. Qabel ma jinbeda l-assaġġ, importanti li wiehed ikollu informazzjoni dwar il-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test, b'mod partikolari biex ikunu jistgħu jiġu prodotti soluzzjonijiet kimiċi stabbli. Hu neċessarju wkoll li jkun hemm metodu analitiku sensitiv b'mod adegwat għall-verifika tal-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test. Fuq durata ta' bejn wiehed u ieħor 16-il ġimgħa, l-assaġġ jehtieg numru totali ta' 480 animal, jiġifieri embrijuni *X. laevis* (jew 640 embrijun, jekk jintuża kontroll b'solvent) biex tiġi żgurata saħħa suffiċjenti tat-test għall-evalwazzjoni tal-punti ta' tmiem rilevanti għall-popolazzjoni bħat-tkabbir, l-iżvilupp u l-maturazzjoni riproduttiva.
6. Qabel l-użu tal-metodu ta' ttestjar għall-ittestjar regolatorju ta' tahlita, għandu jiġi kkunsidrat jekk hux se jipprovdi riżultati aċċettabbli għall-iskop regolatorju maħsub. Barra

minn hekk, dan l-assaġġ ma jevalwax il-fekondità direttament, u allura jaf ma jkun applikabbli għall-użu fi stadju aktar avvanzat mil-Livell 4 tal-Qafas Kunċettwali tal-OECD għall-Ittestjar u għall-Valutazzjoni tal-Interferenti Endokrinali.

BAŽI XJENTIFIKA GĦALL-METODU TA' TTESTJAR

7. Hafna mill-fehim kurrenti tagħha dwar il-bijoloġija anfibja nkiseb bl-użu tal-ispeċi mudell tal-laboratorju *X. laevis*. Din l-ispeċi tista' tiġi kulturata bħala rutina fil-laboratorju, l-ovulazzjoni tista' tiġi indotta bl-użu ta' gonadotropina korjonika umana (hCG) u l-istokkijiet tal-annimali huma disponibbli minnufih minghand nissjela kummerċjali.
8. Bħall-vertebrati kollha, ir-riproduzzjoni fl-anfibji hi taħt il-kontroll tal-assi ipotalamiku pitwitarju gonadali (HPG) (4). L-estrogeni u l-androgeni huma medjaturi ta' din is-sistema endokrinali, u jidderieġu l-iżvilupp u l-fizjoloġija ta' tessuti sesswalment dimorfiċi. Hemm tliet fażijiet distinti fiċ-ċiklu tal-ħajja tal-anfibji meta dan l-ass ikun partikolarment attiv: (1) differenzazzjoni gonadali matul l-iżvilupp tal-larva, (2) l-iżvilupp ta' karatteristiċi sesswali sekondarji u maturazzjoni gonadali matul il-fażi li fiha l-anfibji jkunu għandhom qed jikbru u (3) ir-riproduzzjoni funzjonali tal-adulti. Kull waħda minn dawn it-tliet twieqi tal-iżvilupp aktarx li tkun suxxettibbli għal perturbazzjoni endokrinali minn ċerti sustanzi kimiċi bħal estrogeni u androgeni, u finalment twassal għal telfien tal-idoneità riproduttiva mill-organiżmi.
9. Il-gonadi jibdew bl-iżvilupp fl-istadju 43 tal-NF, meta jiżviluppa x-xifer ġentali bipotenzjali għall-ewwel darba. Id-differenzazzjoni tal-gonadi tibda fl-istadju 52 tal-NF meta ċ-ċelloli ġerminali primordjali jimigraw fit-tessut medullari (irġiel) jew jibqgħu fir-reġjun kortikali (nisa) tal-gonadi tal-iżvilupp (3). Dan il-proċess ta' differenzazzjoni sesswali tal-gonadi ġie rrapportat għall-ewwel darba bħala suxxettibbli għal alterazzjoni kimika f'*Xenopus* fil-ħamsinijiet (5) (6). L-esponiment tal-imrieżeb għall-estradjol matul dan il-perjodu ta' differenzazzjoni gonadali jirriżulta f'tibdil tas-sess tal-irġiel li, meta jsiru adulti, isiru nisa kompletament funzjonali (7) (8). It-tibdil tas-sess funzjonali tan-nisa f'irġiel hu possibbli wkoll u ġie rrapportat wara l-impjantazzjoni tat-tessut tat-testikoli fl-imrieżeb (9). Madankollu, għalkemm l-esponiment għal inibitur tal-aromatażi jikkawża tidwir tas-sess funzjonali wkoll f'*X. tropicalis* (10), dan ma ntweriex li jseħħ f'*X. laevis*. Storikament, l-effetti tossiċi fuq id-differenzazzjoni gonadali ġew ivvalutati b'eżami istoloġiku tal-gonadi fil-metamorfosi u t-tibdil tas-sess seta' jiġi determinat b'analizi tal-proporzjonijiet tas-sess biss. Sa ftit taż-żmien ilu, ma kien hemm ebda mezz biex jiġi determinat b'mod dirett is-sess ġenetiku ta' *Xenopus*. Madankollu, stabbiliment riċenti ta' markaturi marbuta mas-sess f'*X. laevis* jagħmilha possibbli li jiġi determinat is-sess ġenetiku u jippermetti għall-identifikazzjoni diretta ta' annimali li jbiddu s-sess (11).

10. Fl-irġiel, l-iżvilupp tal-ħut li jkun għadu qed jikber jipproċedi hekk kif il-livelli ta' testosterone fid-demm jizdiedu b'mod korrispondenti għall-iżvilupp ta' karatteristiċi sesswali sekondarji kif ukoll għall-iżvilupp tat-testikoli. Fin-nisa, l-estradijoli jiġi prodott mill-ovarji u jirriżulta fid-dehra tal-vitellogenina (VTG) fil-plażma, f'oociti vitellogeniċi fl-ovarju u fl-iżvilupp ta' ovidotti (12). L-ovidotti huma karatteristiċi sesswali sekondarji tan-nisa li jiffunzjonaw fil-maturazzjoni tal-oociti matul ir-riproduzzjoni. Il-kisjiet tal-ġeli jiġu applikati man-naħa ta' barra tal-oociti hekk kif jgħaddu mill-ovidott u jingabru fil-borża tal-ovarju, lesta għall-fertilizzazzjoni. L-iżvilupp tal-ovidotti jidher li hu regolat mill-estrogeni hekk kif l-iżvilupp jikkorrelata mal-livelli ta' estradijoli fid-demm f'*X. laevis* (13) u f'*X. tropicalis* (12). Għe rrapportat l-iżvilupp ta' ovidotti fl-irġiel wara l-esponiment għal komposti tal-poliklorobifenili (14) u għal 4-*terz*-ottilfenol (15).

PRINĊIPJU TAT-TEST

11. Id-disinn tat-test jinvolvi l-esponiment tal-embrijuni ta' *X. laevis* fl-istadju 8-10 tal-NF permezz tar-rotta mal-ilma għal erba' konċentrazzjonijiet differenti tas-sustanza kimika tat-test kif ukoll għall-kontroll(i) sa 10 ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 tal-NF fil-kontroll, b'subkampjun interim wiehed fl-istadju 62 tal-NF. Filwaqt li jista' jkun possibbli wkoll li sustanzi kimiċi ferm idrofobiċi jingħataw mal-għalf, s'issa ftit li xejn kien hemm esperjenza bl-użu ta' din ir-rotta ta' esponiment f'dan l-assaġġ. Hemm erba' repliki f'kull konċentrazzjoni tat-test bi tmien repliki għal kull kontroll użat. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment jinkludu dawk li jindikaw tossiċità ġeneralizzata (jiġifieri l-mortalità, l-imġiba anormali u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (tul u piż)), kif ukoll il-punti ta' tmiem imfassla biex jikkaratterizzaw modalitajiet ta' azzjoni speċifiċi tat-tossiċità endokrinali mmirati lejn proċessi fiżjoloġiċi medjati bl-estrogeni, bl-androgeni jew bit-tirojde (jiġifieri istopatoloġija tat-tirojde, istopatoloġija tal-gonadi u tal-kanal tal-gonadi, żvilupp anormali, vitellogenina tal-plażma (fakultattiva), u proporzjonijiet tas-sess ġenotipiku/fenotipiku).

KRITERJI TA' VALIDITÀ TAT-TEST

12. Japplikaw il-kriterji li ġejjin għall-validità tat-test:

- Il-konċentrazzjoni tal-ossigenu dissolt għandha tkun ≥ 40 % tal-valur tas-saturazzjoni tal-arja matul it-test;
- It-temperatura tal-ilma għandha tkun fil-medda ta' 21 ± 1 °C u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbu 1-1,0 °C;
- Il-pH tas-soluzzjoni tat-test għandha tinzamm bejn 6,5 u 8,5, u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhiex taqbeż iż-0,5;

- Għandha tkun disponibbli evidenza li turi li l-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti fi hdan $\pm 20\%$ tal-valuri medji mkejla;
 - Il-mortalità tul il-perjodu ta' esponiment għandha tkun ta' $< 20\%$ f'kull replika fil-kontrolli;
 - vijabbiltà ta' $\geq 70\%$ fis-sugġetti riprodotti magħżula biex jinbeda l-istudju;
 - Iż-żmien medjan għall-istadju 62 tal-NF tal-kontrolli għandu jkun ta' ≤ 45 jum.
 - Il-piż medju tal-organizmi tat-test fl-istadju 62 tal-NF u fit-terminazzjoni tal-assaġġ fil-kontrolli u fil-kontrolli b'solvent (jekk użati) għandu jilhaq il- $1,0 \pm 0,2$ u $11,5 \pm 3$ g, rispettivament.
13. Filwaqt li mhuwiex kriterju ta' validità, hu rakkomandat li jkun hemm disponibbli għall-analiżi tal-anqas tliet livelli ta' trattament bi tliet repliki mhux kompromessi. Mortalità eċċessiva, li tikkomprometti trattament, hi definita b'hala > 4 mortalitajiet ($> 20\%$) f'2 repliki jew aktar li ma jistgħux jiġu spjegati minn errur tekniku. Tal-anqas tliet livelli ta' trattament mingħajr tossiċità ċara ovvja għandhom ikunu disponibbli għall-analiżi. Sinjali ta' tossiċità ċara jistgħu jinkludu, iżda mhumiex limitati għal, żamma fil-wieċċ, tluq fil-qiegħ tat-tank, għawm invertit jew irregolari, nuqqas ta' attività ta' tluq fil-wieċċ, u nuqqas ta' rispons għal stimoli, anormalitajiet morfoloġiċi (eż. deformitajiet fl-estremittajiet), leżjonijiet emorraġiċi, u edema addominali.
14. F'każ ta' devjazzjoni mill-kriterji ta' validità tat-test, għandhom jiġu kkunsidrati l-konsegwenzi b'rabta mal-affidabbiltà tar-riżultati tat-test u dawn id-devjazzjonijiet u l-kunsiderazzjonijiet għandhom jiġu inklużi fir-rapport tat-test.

DESKRIZZJONI TAL-METODI

Apparat

15. Tagħmir normali tal-laboratorju u speċjalment dan li ġej:
- (a) apparat għall-kontroll tat-temperatura (eż., ħiters jew berrieda aġġustabli sa 21 ± 1 °C);
 - (b) termometru;
 - (c) mikroskopju ta' dissezzjoni binokulari u għodod tad-dissezzjoni;
 - (d) kamera diġitali b'riżoluzzjoni minima ta' 4 megapixels u b'mikrofunzjoni (jekk meħtieġa);
 - (e) miżien analitiku li kapaċi jkejjel sa 0,001 mg jew 1 µg;
 - (f) apparat li jkejjel l-ossiġenu dissolt u apparat li jkejjel il-pH;

- (g) apparat li jkejjel l-intensità tad-dawl li kapaċi jkejjel f'unitajiet lux;

L-ilma

Sors u kwalità

16. Jista' jintuża kwalukwe ilma ta' dilwizzjoni li jkun disponibbli lokalment (eż. ilma tan-nixxieġha jew ilma tal-vit iffiltrat bil-faħam) u jippermetti tkabbir u żvilupp normali ta' *X. laevis*, u għandha tkun disponibbli evidenza ta' tkabbir normali f'dan l-ilma. Peress li l-kwalità tal-ilma lokali tista' tvarja b'mod sostanzjali bejn zona u oħra, għandha tiġi analizzata l-kwalità tal-ilma, b'mod partikolari jekk ma jkunx hemm disponibbli *data* storika dwar l-użu tal-ilma għat-trobbija tal-larva tal-anfibji. Il-kejl tal-metalli tqal (eż. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), l-anjoni u l-katjoni kbar (eż. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), il-pestiċidi, il-karbonju organiku totali u s-solidi sospiżi għandu jsir qabel ma jibda l-ittestjar u/jew, pereżempju, kull sitt xhur meta l-ilma tad-dilwizzjoni jkun magħruf li jkun relattivament kostanti fil-kwalità. Ċerti karatteristiċi kimiċi tal-ilma ta' dilwizzjoni aċċettabbli huma elenkati fl-Appendiċi 2.

Konċentrazzjoni ta' jodur fl-ilma tat-test

17. Biex il-glandola tat-tirojde tissintetizza l-ormoni tat-tirojde biex issostni l-metamorfosi normali, irid jitqiegħed għad-dispożizzjoni biżżejjed jodur għal-larva permezz ta' tahlita ta' sorsi milwiema u djetetiċi. Bħalissa, ma hemm ebda linja gwida derivata empirikament għall-konċentrazzjonijiet minimi tal-jodur fl-ikel jew fl-ilma biex jiġi żgurat żvilupp xieraq. Madankollu, id-disponibbiltà tal-jodur tista' taffettwa r-risponsività tas-sistema tat-tirojde għal aġenti attivi fit-tirojde u hi magħrufa li timmodula l-attività tal-baži tal-glandola tat-tirojde, u jisthoqqilha attenzjoni meta jiġu interpretati r-riżultati mill-istopatoloġija tat-tirojde. Fuq il-baži tal-ħidma preċedenti, intwera li l-assaġġ irnexxa meta l-konċentrazzjonijiet tal-jodur (I^-) fl-ilma ta' dilwizzjoni jvarjaw bejn 0,5 u 10 $\mu\text{g/l}$. Idealment, il-konċentrazzjoni minima tal-jodur fl-ilma ta' dilwizzjoni matul it-test għandha tkun ta' 0,5 $\mu\text{g/l}$ (miżjud bħala melħ tas-sodju jew tal-potassju). Jekk l-ilma tat-test jiġi rikostitwit minn ilma dejonizzat, il-jodju għandu jiżdied b'konċentrazzjoni minima ta' 0,5 $\mu\text{g/l}$. Il-konċentrazzjonijiet imkejla tal-jodur mill-ilma tat-test (jiġifieri l-ilma ta' dilwizzjoni) u s-supplimentazzjoni tal-ilma tat-test ma' jodju jew ma' mluħ oħra (jekk jintużaw) għandhom jiġu rapportati. Il-kontenut ta' jodju jista' jitkejjel fl-ikel ukoll minbarra fl-ilma tat-test.

Sistema ta' esponiment

18. It-test ġie żviluppat bl-użu ta' sistema dilwitur bi fluss kontinwu. Il-komponenti tas-sistema għandu jkollhom komponenti li jmissu mal-ilma tal-ħġieġ, tal-azzar inossidabbli u/jew ta' materjali kimikament inertti oħra. It-tankijiet ta' esponiment għandhom ikunu

akkwarji tal-ħgieg jew tal-azzar inossidabbli u l-volum utilizzabbli tat-tank għandu jkun bejn 4,0 u 10,0 l (fond minimu tal-ilma ta' 10 sa 15-il cm). Is-sistema għandha tkun tiflaħ għall-konċentrazzjonijiet tal-esponiment kollha, għal kontroll, u għal kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn, b'erba' repliki għal kull trattament u tmienja fil-kontrolli. Ir-rata tal-fluss għal kull tank għandha tkun kostanti wara li jingħata kont kemm liż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll lill-esponiment kimiku. Hu rakkomandat li r-rati tal-fluss għandhom ikunu xierqa (eż. tal-anqas 5 tiddiliet tat-tank kuljum) biex jiġi evitat tnaqqis fil-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika minhabba metabolizmu kemm mill-organizmi tat-test kif ukoll mill-mikroorganizmi akwatċi fl-akkwarji jew fir-rotot abijotiċi ta' degradazzjoni (idrolizi, fotolizi) jew dissipazzjoni (volatilizzazzjoni, sorbiment). It-tankijiet tat-trattament għandhom jiġu assenjati għal għarrieda għal pożizzjoni fis-sistema ta' esponiment biex jitnaqqsu l-effetti pożizzjonali potenzjali, inklużi ċaqliqiet żgħar fit-temperatura, l-intensità tad-dawl, *eċċ.* Aktar informazzjoni dwar kif jiġu stabbiliti sistemi ta' esponiment bi fluxx kontinwu tista' tinkiseb mill-Gwida Standard tal-ASTM għat-Twettiq ta' Testijiet tat-Tossiċità Akuta fuq Materjali tat-Test b'Ħut, b'Makroinvertebrati, u b'Anfibji (16).

Twassil tas-sustanza kimika: thejjija tas-soluzzjonijiet tat-test

19. Biex isiru s-soluzzjonijiet tat-test fis-sistema ta' esponiment, is-soluzzjoni ewlenija tas-sustanza kimika tat-test għandha tiġi dożata fis-sistema ta' esponiment b'pompa xierqa jew b'apparat ieħor. Ir-rata ta' fluxx tas-soluzzjoni ewlenija għandha tiġi kalibrata skont konferma analitika tas-soluzzjonijiet tat-test qabel it-tnedija tal-esponiment, u tiġi verifikata volumetrikament kull ċertu żmien matul it-test. Il-volum tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartiment għandu jiġġedded tal-anqas hames darbiet kull jum.
20. Il-metodu użat biex is-sustanza kimika tat-test tiddaħhal fis-sistema jista' jvarja skont il-proprjetajiet fiżikokimiċi tagħha. Għaldaqstant, qabel it-test għandha tinkiseb informazzjoni bażi dwar is-sustanza kimika li tkun rilevanti għad-determinazzjoni tat-testabbiltà tagħha. Informazzjoni utli dwar il-proprjetajiet speċifiċi għas-sustanza kimika tat-test tinkludi l-formula strutturali, il-piż molekulari, il-purità, l-istabbiltà fl-ilma u fid-dawl, il-pK_a u l-K_{ow}, is-solubbiltà fl-ilma (idealment fil-medium tat-test) u l-pressjoni tal-fwar kif ukoll ir-riżultati ta' test għal bijodegradabbiltà immedjata (metodu ta' ttestjar C.4 (17) jew C.29 (18)). Is-solubbiltà u l-pressjoni tal-fwar jistgħu jintużaw biex jikkalkolaw il-kostant tal-ligi ta' Henry, li se jindika jekk it-telf minhabba l-evaporazzjoni tas-sustanza kimika tat-test jistax iseħħ. It-twettiq ta' dan it-test mingħajr l-informazzjoni elenkata hawn fuq għandu jiġi kkunsidrat bir-reqqa peress li d-disinn tal-istudju se jkun jiddependi mill-proprjetajiet fiżikokimiċi tas-sustanza kimika tat-test u, mingħajr dawn ir-riżultati tat-test għad-*data* jaf ikun diffiċli li jiġi interpretat jew ikun insinifikanti. Għandu jkun hemm metodu analitiku affidabbli disponibbli għall-kwantifikazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjonijiet tat-test, b'akkuratezza magħrufa u rapportata kif ukoll b'limitu ta'

detezzjoni. Sustanzi kimiċi tat-test solubbli fl-ilma jistgħu jiġu dissolti f'alikwoti tal-ilma ta' dilwizzjoni f'konċentrazzjoni li tippermetti t-twassil bil-konċentrazzjoni tat-test fil-mira f'sistema bi fluss kontinwu. Sustanzi kimiċi li huma likwidi jew solidi f'temperatura ambejntali u moderatament solubbli fl-ilma jistgħu jkunu jeħtieġu saturaturi likwidu:likwidu jew likwidu:solidu (eż. kolonna tas-suf tal-ħġieġ) (19). Filwaqt li jista' jkun possibbli wkoll li sustanzi kimiċi tat-test idrofobiċi ħafna jingħataw mal-ġhalf, ftit li xejn kien hemm esperjenza bl-użu ta' dik ir-rotta ta' esponiment f'dan l-assaġġ.

21. Is-soluzzjonijiet tat-test tal-konċentrazzjonijiet magħżula jithejjew billi tiġi dilwita soluzzjoni ewlenija. Is-soluzzjoni ewlenija preferibbilment għandha tithejja billi sempliċiment tithallat jew tithawwad is-sustanza kimika tat-test fl-ilma ta' dilwizzjoni b'mezzi mekkaniċi (eż. bit-thawwid jew bl-ultrasonikazzjoni). Jistgħu jintużaw kolonni/sistemi ta' saturazzjoni jew metodi ta' dożaġġ passiv (20) biex tinkiseb soluzzjoni ewlenija kkonċentrata kif xieraq. Il-preferenza hi li tintuża sistema tat-test ħielsa minn kosolvent; madankollu, sustanzi kimiċi tat-test differenti ser ikollhom proprjetajiet fiżikokimiċi varji li aktarx li jkunu jeħtieġu approċċi differenti għat-thejjija tal-ilma tal-esponiment tas-sustanza kimika. Għandu jittiehed kull sforz biex jiġu evitati solventi jew trasportaturi għaliex: (1) ċerti solventi nfushom jistgħu jirriżultaw f'tossiċità u/jew f'risponsi mhux mixtieqa jew mhux mistennija, (2) l-ittestjar ta' sustanzi kimiċi f'livell oġġla mis-solubbiltà fl-ilma tagħhom (hekk kif spiss jista' jseħħ bl-użu tas-solventi) jista' jirriżulta f'determinazzjonijiet imprecizi tal-konċentrazzjonijiet effettivi, (3) l-użu ta' solventi f'testijiet aktar fit-tul jista' jirriżulta fi grad sinifikanti ta' "biofilming" assoċjata ma' attività mikrobika li tista' tħalli impatt fuq il-kundizzjonijiet ambejntali kif ukoll fuq il-ħila li jinżammu l-konċentrazzjonijiet tal-esponiment u (4) l-assenza ta' *data* storika li turi li s-solvent ma jinfluwenzax l-eżitu tal-istudju, l-użu ta' solventi jeħtieġ trattament ta' kontroll b'solvent li għandu implikazzjonijiet sinifikanti fuq il-benessri tal-annimali peress li jkunu meħtieġa annimali addizzjonali biex isir it-test. Għal sustanzi kimiċi li diffiċli tittestjahom, solvent jista' jintuża bħala l-aħħar rikors, u għandu jiġi kkonsultat id-Dokument ta' Gwida tal-OECD dwar l-Ittestjar tat-Tossiċità Akkwatika ta' Sustanzi u ta' Taħlitiet Diffiċli (21) biex jiġi determinat l-aħjar metodu. L-għażla tas-solvent se tiġi determinata mill-proprjetajiet kimiċi tas-sustanza kimika tat-test u mid-disponibbiltà ta' *data* storika tal-kontroll dwar is-solvent. Fin-nuqqas ta' *data* storika, l-adegwatezza ta' solvent għandha tiġi determinata qabel ma jsir l-istudju definittiv. F'każ li l-użu ta' solvent ma jkunx evitabbli, u sseħħ attività mikrobika (biofilming), hu rakkomandat li jinżamm rekord/li jiġi rapportat dwar il-biofilming għal kull tank (tal-anqas kull ġimgħa) matul it-test shiħ. Idealment, il-konċentrazzjoni tas-solvent għandha tinżamm kostanti fil-kontroll b'solvent u fit-trattamenti kollha tat-test. Jekk il-konċentrazzjoni tas-solvent ma tinżammx kostanti, għandha tintuża l-oġġla konċentrazzjoni tas-solvent fit-trattament tat-test fil-kontroll b'solvent. F'każijiet li fihom jintuża trasportatur tas-solvent, il-konċentrazzjonijiet massimi tas-solvent ma għandhomx jaqbżu 1-100 µl/l jew il-100 mg/l (21), u hu

rakkomandat li l-konċentrazzjoni b'solvent tinżamm għall-anqas livell possibbli (eż. ≤ 20 $\mu\text{l/l}$) biex jiġu evitati effetti potenzjali tas-solvent fuq il-punti ta' tmiem imkejla (22).

L-annimali tat-test

Speċijiet tat-test

22. L-ispeċi tat-test hi *X. laevis* għaliex din: (1) tiġi kulturata bħala rutina f'laboratorji madwar id-dinja, (2) tinkiseb faċilment mingħand fornituri kummerċjali u (3) is-sess ġenetiku tagħha jista' jiġi determinat.

Tgħammir u indukrar tal-adulti

23. Kura u tgħammir xierqa ta' *X. laevis* huma deskritti minn linja gwida standardizzata (23). L-abitazzjoni u l-kura ta' *X. laevis* huma deskritti wkoll minn Read (24). Biex jiġi pprovat it-tgħammir, tlieta sa hames pari nisa u rġiel adulti jiġu injettati b'mod intraperitoneali b'gonadotropina korjonika umana (hCG). Eżemplari nisa u rġiel jiġu injettati b'eż., bejn wiehied u ieħor 800-1000 IU u 500-800 IU, rispettivament, ta' hCG dissolta f'0,6-0,9 % soluzzjoni salina (jew is-soluzzjoni taż-żringijiet ta' Ringer, salina isotonika għall-użu bl-anfibji; www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html). Il-volumi tal-injezzjoni għandhom ikunu madwar $\mu\text{l/g}$ piż tal-ġisem (~ 1000 μl). Wara, il-pari għat-tgħammir jinżammu f'tankijiet kbar, mhux disturbati u f'kundizzjonijiet statiči biex tiġi promossa l-amplessi. Il-qiegh ta' kull tank tat-tgħammir għandu jkollu qiegh falz ta' xibka tal-azzar inossidabbli (eż. fethiet ta' 1,25 cm) li tippermetti biex il-bajd jaqa' f'qiegh it-tank. Iż-żringijiet injettati b'hCG aktar tard waranofsinar normalment jiddepożitaw hafna mill-bajd tagħhom sa nofs l-ghodwa tal-ghada. Wara li tinheles u tiġi fertilizzata kwantità suffiċjenti ta' bajd, l-adulti għandhom jitnehhew mit-tankijiet tat-tgħammir. Imbagħad il-bajd jingabar u r-riti tal-ġeli jitnehhew bi trattament taċ-ċisteina-L (23). Għandha tithejja soluzzjoni ta' 2 % ċisteina-L u l-pH għandha tiġi aġġustata għal 8,1 b'1 M NaOH. Din is-soluzzjoni ta' 21 °C tiżdied ma' flask Erlenmeyer ta' 500 ml li jkun fih il-bajd minn riproduzzjoni waħda u tithawwad ġentilment għal minuta jew żewġ minuti u mbagħad titlaħlaħ sew 6-8 darbiet b'ilma tal-koltura ta' 21 °C. Imbagħad il-bajd jiġi trasferit f'dixx kristallizzanti u jiġi determinat li jkun > 70 % vijabbli b'anormalitajiet minimi f'embrijuni li jesibixxu diviżjoni taċ-ċelloli.

DISINN TAT-TEST

Konċentrazzjonijiet tat-test

24. Hu rakkomandat li tal-anqas jintużaw erba' konċentrazzjonijiet kimiċi u kontrolli xierqa (inkluzi kontrolli b'solvent, jekk ikun hemm bżonn). Ġeneralment tkun rakkomandata separazzjoni tal-konċentrazzjoni (fattur ta' spazjar) li ma taqbiżx it-3,2.

25. Għall-finijiet ta' dan it-test, ir-riżultati mill-istudji eżistenti fuq l-anfibji għandhom jintużaw sa fejn possibbli fid-determinazzjoni tal-oġġla konċentrazzjoni tat-test biex jiġu evitati konċentrazzjonijiet li jkunu tossiċi wisq. Informazzjoni minn, pereżempju, relazzjonijiet kwantitattivi bejn l-istruttura u l-attività, read across u *data* minn studji eżistenti fuq l-anfibji bħall-Assaġġ ta' Metamorfosi tal-Anfibji, il-metodu ta' ttestjar C.38 (25) u l-Assaġġ tat-Teratogenezi tal-Embrijuni taż-Żringijiet - *Xenopus* (23) u/jew testijiet fuq ħut bħall-metodi ta' ttestjar C.48, C.41 u C.49 (26) (27) (28) jistgħu jikkontribwixxu għall-issettjar ta' din il-konċentrazzjoni. Qabel ma jsir il-LAGDA jista' jsir esperiment ta' sejbien tal-medda. Hu rakkomandat li l-esponiment tas-sejbien tal-medda tinbeda fi hdan 24 siegħa mill-fertilizzazzjoni u tkompli għal 7-14-il jum (jew aktar, jekk ikun hemm bżonn) u l-konċentrazzjonijiet tat-test jiġu ssettjati b'tali mod li l-intervalli bejn il-konċentrazzjonijiet tat-test ma jkunux akbar minn fattur ta' 10. Ir-riżultati tal-esperiment ta' sejbien tal-medda għandhom iservu biex tiġi ssettjata l-oġġla konċentrazzjoni tat-test fil-LAGDA. Kun af li jekk ikun intuża solvent, l-adekwatezza tas-solvent (jiġifieri jekk ikollux impatt fuq l-eżitu tal-istudju) tista' tiġi determinata bħala parti mill-istudju ta' sejbien tal-medda.

Repliki fi hdan gruppi ta' trattament u kontrolli

26. Għandhom jintużaw minimu ta' erba' tankijiet ta' repliki għal kull konċentrazzjoni tat-test u minimu ta' tmien repliki għall-kontrolli (u l-kontroll b'solvent, jekk ikun hemm bżonn) (jiġifieri n-numru ta' repliki fil-kontroll u fi kwalunkwe kontroll b'solvent għandu jkun id-doppju tan-numru ta' repliki ta' kull grupp tat-trattament, biex tiġi żgurata saħħa statistika xierqa). Kull replika ma għandux ikun fiha aktar minn 20 animal. In-numru minimu ta' annimali proċessati jkun ta' 15 (5 għas-subkampjun tal-istadju 62tal-NF u 10 ħutiet li għadhom qed jikbru). Madankollu, annimali addizzjonali jiżdiedu f'kull replika biex titqies il-possibbiltà ta' mortalità filwaqt li jinżamm in-numru kritiku ta' 15.

PROCEDURA

Harsa ġenerali lejn l-assaġġ

27. L-assaġġ jitnieda b'embrijuni riprodotti godda (sadju 8-10 ta' NF) u jkompli tul l-iżvilupp tal-ħut li jkun għadu qed jikber. L-annimali jiġu eżaminati ta' kuljum għall-mortalità u għal kwalunkwe sinjal ta' mġiba anormali. Fl-istadju 62 ta' NF, jingabar subkampjun ta' larva (sa hames annimali għal kull replika) u jiġu eżaminati diversi punti ta' tmiem (Tabella 1). Wara li l-annimali jkollha jkunu laħqu l-istadju 66 ta' NF, jiġifieri t-tlestija tal-metamorfosi (jew wara 70 jum mit-tnedija tal-assaġġ, skont liem jiġi l-ewwel), isir qtil aleatorju (izda mingħajr subkampjunar) biex in-numru ta' annimali jitnaqqas (10 għal kull tank) (ara l-paragrafu 43), u l-annimali li jifdal jkompli bl-esponiment sa 10 ġimgħat wara

ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontroll. Fit-terminazzjoni tat-test (kampjunar tal-hut li jkun għadu qed jikber) isiru kejljiet addizzjonali (Tabella 1).

Kundizzjonijiet ta' esponiment

28. Sommarju shiħ tal-parametri tat-test jista' jinstab fl-Appendiċi 3. Matul il-perjodu ta' esponiment, l-ossigenu dissolt, it-temperatura, u l-pH tas-soluzzjonijiet tat-test għandhom jitkejlu ta' kuljum. Il-konduttività, l-alkalinità, u l-ebusija jitkejlu darba fix-xahar. Għat-temperatura tal-ilma tas-soluzzjonijiet tat-test, id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti (fi hdan jum) ma għandhomx jaqbu 1-1,0 °C. Barra minn hekk, għall-pH tas-soluzzjonijiet tat-test, id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhiex taqbez iż-0,5.
29. It-tankijiet ta' esponiment jistgħu jingibdu b'sifun fuq bażi ta' kuljum biex jitneħħew ikel mhux mikul u prodotti tal-iskart, b'attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata tat-tankijiet. Għandha tingħata attenzjoni biex jiġu mminimizzati l-istress u t-trauma għall-annimali, speċjalment matul iċ-ċaqliq, it-tindif tal-akkwarji, u l-manipolazzjoni. Kundizzjonijiet/attivitajiet ta' stress għandhom jiġu evitati bħal storbu qawwi u/jew bla heda, taptip fuq l-akkwarji, theżżiziet fit-tank.

Id-durata tal-esponiment għas-sustanza kimika tat-test

30. L-esponiment jitnieda b'embrijuni riprodotti godda (stadju 8-10 ta' NF) u jitkompla sa għaxar ġimgħat wara ż-żmien medjan għall-istadju 62 ta' NF (≤ 45 jum mit-tnedija tal-assaġġ) fil-grupp tal-kontroll. Generalment, id-durata tal-LAGDA hi ta' 16-il ġimgħa (massimu ta' 17-il ġimgħa).

Tnedija tal-assaġġ

31. Għandu jkun intwera minn qabel li l-annimali ġenituri użati għall-assaġġ jipproduċu wlied li jistgħu jitqassmu skont is-sess ġenetiku (Appendiċi 5). Wara r-riproduzzjoni bejn l-adulti, l-embrijuni jingabru, u jiġu trattati b'ċisteina biex titneħħa r-rita tal-ġeli u jiġu skrinjati għall-vijabbiltà (23). It-trattament biċ-ċisteina jippermetti li l-embrijuni jiġu mmanigġjati matul l-iskrinjar mingħajr ma jehlu mas-superfċji. L-iskrinjar isehh taht mikroskopju tad-dissezzjoni bl-użu ta' kontagoċċi tal-ġhajnejn ta' daqs xieraq biex jitneħħew embrijuni mhux vijabbli. Idealment għat-test tintuża riproduzzjoni waħda li tirrizulta f'vijabbiltà ta' aktar minn 70 %. Embrijuni fl-istadju 8-10 ta' NF jitqassmu b'mod aleatorju f'tankijiet tat-trattament bl-esponiment li jkun fihom volum xieraq ta' ilma ta' dilwizzjoni sakemm kull tank ikun fih 20 embrijun. L-embrijuni għandhom jiġu mmanigġjati b'attenzjoni matul dan it-trasferiment biex jitnaqqas kemm jista' jkun l-istress marbut mal-immanigġjar u jiġi evitat milli jwegġġghu. 96 siegħa wara l-fertilizzazzjoni, l-imrieżeb għandhom ikunu telgħu fil-kolonna tal-ilma u bdew jaqbd mal-ġnub tat-tank.

Reġim tal-ġhalf

32. L-ġhalf u r-rata tal-ġhalf jinbidlu matul l-istadji differenti tal-ħajja ta' *X. laevis* u huma aspekk importanti ħafna tal-protokoll tal-LAGDA. Tagħlif eċċessiv matul il-fażi tal-larva tipikament jirriżulta f'incidenzi akbar u f'severità akbar tal-iskoljozi (l-Appendiċi 8) u għandu jiġi evitat. Għall-kuntrarju, tagħlif inadegwat matul il-fażi tal-larva jirriżulta f'rati ta' żvilupp varjabbli ħafna fost il-kontrolli li potenzjalment jikkoprometti s-saħħa statistika jew iħawwad ir-riżultati tat-test. L-Appendiċi 4 jipprovdi dieta għal-larva u għall-ħut li jkun għadu qed jikber u reġimi tat-tagħlif rakkomandati għal *X. laevis* f'kundizzjonijiet bi fluss kontinwu, iżda alternattivi huma permissibbli dment li l-organizmi tat-test jikbru u jiżviluppaw b'mod sodisfaċenti. Importanti li jiġi nnotat li jekk ikunu qed jitkejlu l-punti ta' tmiem speċifiċi għall-endokrina, l-ġhalf għandu jkun ħieles minn sustanzi attivi fl-endokrina bħall-grixa tas-sojja.

Tagħlif tal-larva

33. Id-dieta rakkomandata tal-larva tikkonsisti f'tagħlif tal-bidu għat-troti, f'diski tal-alga *Spirulina* u fi krisps tal-ħut aħmar (eż. TetraFin® flakes, Tetra, il-Ġermanja) imħallta flimkien f'ilma tal-koltura (jew tad-dilwizzjoni). Din it-taħlita tingħata tliet darbiet kuljum matul il-ġimġha u darba kuljum fi tmiem il-ġimġha. L-imrieżeb jitgħalfu wkoll gamblu tal-ilma mielaħ, *Artemia* spp., nauplii li jkollhom 24 siegħa, darbtejn kuljum matul il-ġimġha u darba kuljum fi tmiem il-ġimġha bl-ewwel jum li jaħbat il-jum 8 ta' wara l-fertilizzazzjoni. It-tagħlif tal-larva, li għandu jkun konsistenti f'kull reċipjent tat-test, għandu jippermetti tkabbir u żvilupp xierqa għall-annimali tat-test biex jiġu żgurati riprodubbiltà u trasferibbiltà tar-riżultati tal-assaġġ: (1) iż-żmien medjan għall-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli għandu jkun ≤ 45 jum u hu rakkomandat (2) piż medju fi ħdan $1,0 \pm 0,2$ g fl-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli.

Tagħlif taż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru

34. Ladarba titlesta l-metamorfosi, ir-reġim tat-tagħlif jikkonsisti f'ikel taż-żringijiet premium sinking, eż., Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, FL, l-Istati Uniti) (Appendiċi 4). Għaž-żgħar taż-żringijiet (ħut fi stadju bikri li jkun għadu qed jikber), il-gerbub jingħadda għal ħin qsair f'mithan tal-kafè, fi blender jew jitkisser b'mehrież u b'lida biex jitnaqqas id-daqs tagħhom. Ladarba l-ħut li jkun għadu qed jikber isir kbir biżżejjed biex jikkonsma gerbub sħiħ, it-tħin jew it-tkissir ma jibqax neċessarju. L-annimali għandhom jintemgħu darba kull jum. It-tagħlif tal-ħut li jkun għadu qed jikber għandu jippermetti tkabbir u żvilupp xierqa tal-organizmi: hu rakkomandat piż medju fi ħdan $11,5 \pm 3$ g fil-ħut tal-kontroll li jkun għadu qed jikber fit-terminazzjoni tal-assaġġ.

Kimika analitika

35. Qabel it-tnedija tal-assaġġ, għandhom jiġu stabbiliti l-istabbiltà tas-sustanza kimika tat-test (eż. is-solubbiltà, id-degradabbiltà, u l-volatilità) u l-metodi analitiċi kollha, eż. bl-użu tal-informazzjoni jew tal-għarfien eżistenti. Meta d-dożaġġ isir permezz tal-ilma ta' dilwizzjoni, hu rakkomandat li s-soluzzjonijiet tat-test minn kull konċentrazzjoni tat-tank ta' replika jiġu analizzati qabel it-tnedija tat-test biex tiġi verifikata l-prestazzjoni tas-sistema. Matul il-perjodu ta' esponiment, il-konċentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test jiġu determinati f'intervalli xierqa, idealment kull ġimgħa għal tal-anqas replika waħda f'kull grupp tat-trattament, b'rotazzjoni bejn ir-repliki tal-istess grupp tat-trattament kull ġimgħa. Hu rakkomandat li r-riżultati jkunu bbażati fuq il-konċentrazzjonijiet imkejla. Madankollu, jekk matul it-test il-konċentrazzjoni tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni tkun inżammiet b'mod sodisfaċenti bejn $\pm 20\%$ tal-konċentrazzjoni nominali, ir-riżultati jkunu jistgħu jiġu bbażati fuq valuri nominali jew valuri mkejla. Barra minn hekk, il-koeffiċjent ta' varjazzjoni (CV) tal-konċentrazzjonijiet tat-test imkejla tul il-perjodu shiħ tat-test fi hdan trattament għandu jinżamm għal 20% jew anqas f'kull konċentrazzjoni. Meta l-konċentrazzjonijiet imkejla ma jibqgħux fi hdan $80-120\%$ tal-konċentrazzjoni nominali (pereżempju meta jiġu testjati sustanzi kimiċi ferm bijodegradabbli jew assorbenti), il-konċentrazzjonijiet tal-effetti għandhom jiġu determinati u espressi b'rabta mal-konċentrazzjoni medja aritmetika għat-testijiet bi fluss kontinwu.
36. Ir-rati ta' fluss tal-ilma ta' dilwizzjoni u tas-soluzzjoni ewlenija għandhom jiġu verifikati f'intervalli xierqa (eż. tliet darbiet fil-ġimgħa) matul id-durata kollha tal-esponiment. Fil-każ ta' sustanzi kimiċi li ma jistgħux jiġu individwati fil-konċentrazzjonijiet nominali kollha jew f'uħud minnhom (eż. minhabba degradazzjoni jew assorbiment rapidi fir-reċipjenti tat-test, jew b'akkumulazzjoni kimika mmarkata fl-iġsma tal-annimali esposti), hu rakkomandat li r-rata ta' tiġdid tas-soluzzjoni tat-test f'kull kompartment tiġi adattata biex il-konċentrazzjonijiet tat-test jinżammu kostanti kemm jista' jkun.

Osservazzjonijiet u kejljiet tal-punti ta' tmiem

37. Il-punti ta' tmiem evalwati matul l-esponiment huma dawk indikativi tat-tossiċità inklużi l-mortalità, imġiba anormali bħal sinjali kliniċi ta' mard u/jew tossiċitajiet ġenerali, u d-determinazzjonijiet tat-tkabbir (tul u piż), kif ukoll il-punti ta' tmiem tal-patoloġija li jistgħu jirrispondu għal modalitajiet ta' azzjoni tat-tossiċità ġenerali kif ukoll endokrinali mmirati lejn perkorsi medjati bl-estrogenu, bl-androgenu jew bit-tirojde. Barra minn hekk, il-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tista' titkejjel b'mod fakultattiv fit-terminazzjoni tal-assaġġ. Il-kejl tal-VTG jista' jkun siewi fil-fehim tar-riżultati tal-istudju fil-kuntest tal-mekkaniżmi endokrinali għall-EDCs suspettati. Il-punti ta' tmiem u t-tempestività tal-kejljiet huma miġbura fil-qosor fit-Tabella 1.

Tabella 1: Ħarsa ġenerali lejn il-punti ta' tmiem tal-LAGDA

Punti ta' Tmiem*	Kuljum	Kampjunar Interim (Kampjunar tal-larva)	Terminazzjoni tat-Test (Kampjunar tal-hut li jkun għadu qed jikber)
Mortalità u anormalitajiet	X		
Żmien għall-istadju 62 ta' NF		X	
Isto(pato)loġija (glandola tat-tirojde)		X	
Morfometrika (tkabbir fil-piż u fit-tul)		X	X
Indiċi somatiku tal-fwied (LSI)			X
Proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku			X
Istopatoloġija (gonadi, kanali riproduttivi, kilwa u fwied)			X
Vitellogenina (VTG) (fakultattiva)			X

* Il-punti ta' tmiem kollha jiġu analizzati statistikament

Il-mortalità u l-osservazzjonijiet ta' kuljum

38. It-tankijiet tat-test kollha għandhom jiġu verifikati kuljum għal annimali mejtin u l-mortalitajiet għandhom jiġu registrati għal kull tank. L-annimali mejtin għandhom jitneħħew mit-tank tat-test malli jiġu osservati. L-istadju tal-iżvilupp tal-annimali mejtin għandu jiġi kategorizzat bħala qabel l-istadju 68 ta' NF (emergenza ta' qabel l-estremità ta' quddiem), l-istadju 58-62 ta' NF, l-istadju 63-66 ta' NF (bejn l-istadju 62 ta' NF u l-assorbiment tad-denb sħiħ), jew wara l-istadju 66 ta' NF (wara l-larva). Rati tal-mortalità li jaqsbu l-20 % jistgħu jindikaw kundizzjonijiet tat-test mhux xierqa jew effetti tossiċi ċari tas-sustanza kimika tat-test. L-annimali għandhom tendenza li jkunu sensittivi aktar għal avvenimenti tal-mortalità indotti mhux bil-kimika matul l-ewwel ftit jiem tal-iżvilupp wara l-avveniment ta' riproduzzjoni u matul il-climax metamorfika. Mortalità bħal din tista' tkun apparenti mid-*data* tal-kontroll.
39. Barra minn hekk, għandha tiġi registrata kwalunkwe osservazzjoni ta' mġiba anormali, ta' malformazzjonijiet viżibbli ċari (*eż.* skoljozi), jew ta' leżjonijiet. L-osservazzjonijiet ta' skoljozi għandhom jingħaddu (inċidenza) u jiġu gradati skont is-severità (*eż.* mhux rimarkabbli – NR, minima – 1, moderata – 2, severa – 3; Appendiċi 8). Għandhom jittieħdu sforzi biex jiġi żgurat li l-prevalenza ta' skoljozi moderata u severa tkun limitata (*eż.* anqas minn 10 % fil-kontrolli) matul l-istudju kollu, għalkemm prevalenza akbar ta' anormalitajiet fil-kontroll mhux bilfors tkun raġuni għat-twaqqif tat-test. Imġiba normali għal annimali larvali hi kkaratterizzata minn sospensjoni fil-kolonna tal-ilma bid-denb mgħolli 'l fuq fuq ir-ras, taħbit ritmiku regolari tal-pinna tad-denb, tluġħ perjodiku fil-

wiċċ, operkulazzjoni, u risponsività għall-istimoli. Imġiba anormali tinkludi, pereżempju, meta jibqgħu fil-wiċċ, mimdudin f'qiegħ it-tank, jgħowmu b'lura jew b'mod irregolari, ma tantx ikunu attivi fil-wiċċ, u ma jkunux responsivi għall-istimoli. Għall-annimali postmetamorfoċi, minbarra l-imġibiet anormali ta' hawn fuq, għandhom jiġu registrati differenzi kbar fil-konsum tal-ikel bejn it-trattamenti. Sfigurazzjonijiet u leżjonijiet kbar jistgħu jinkludi anormalitajiet morfoloġiċi (eż. deformitajiet tal-estremittajiet), leżjonijiet emorraġiċi, edema addominali, infezzjonijiet batterjali jew fungali, fost ħafna oħrajn. L-okkorrenzi ta' leżjonijiet fuq ras il-ħut li jkun għadu qed jikber, eżatt wara l-imnieher, jistgħu jkun indikazzjonijiet ta' livelli insuffiċjenti ta' umdità. Dawn il-kalkoli huma kwalitattivi u għandhom jitqiesu l-istess bħal sinjali kliniċi ta' mard/stress u jsiru f'paragun mal-annimali tal-kontroll. Jekk ir-rata ta' okkorrenza tkun akbar fit-tankijiet esposti milli fil-kontrolli, f'dak il-każ din għandha titqies bħala evidenza ta' tossiċità ċara.

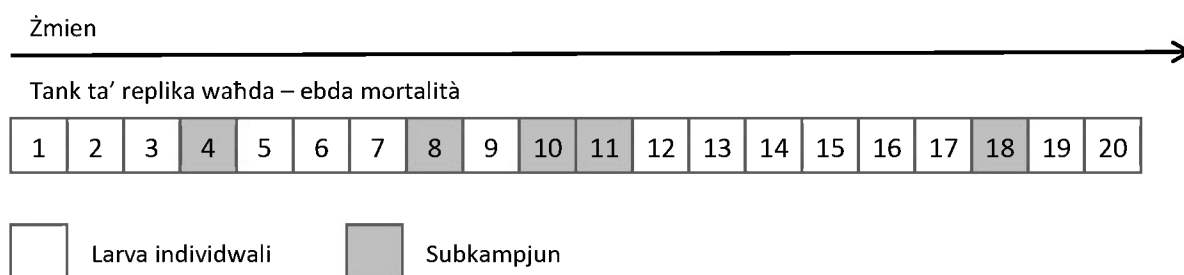
Subkampjunar tal-larva

Spjegazzjoni tas-subkampjunar tal-larva:

40. L-imrieżeb li jilħqu l-istadju 62 ta' NF għandhom jitneħħew mit-tankijiet u jiġu kampjunati jew inkella jiġu mċaqlaqa għall-parti li jmiss tal-esponiment f'tank ġdid, jew inkella jiġu separati fiżikament mill-imrieżeb li jifdal fl-istess tank b'divizur. L-imrieżeb jiġu verifikati ta' kuljum, u jiġi registrat il-jum tal-istadju li fih marżebb jilhaq l-istadju 62 ta' NF. Il-karatteristika definittiva għall-użu f'din il-valutazzjoni hi l-forma tar-ras. Ladarba r-ras tiċkien b'tali mod li bejn wiehded u iehor tkun wiesgħa daqs il-korp tal-marżeb u l-estremittà ta' quddiem fil-livell tan-nofs tal-qalb, dak l-individwu jingħadd bħala li jkun laħaq l-istadju 62 ta' NF.
41. L-għan hu li jittiehed kampjun ta' ħames imrieżeb fl-istadju 62 ta' NF għal kull tank ta' replika. Dan għandu jsir b'mod għalkollox aleatorju, iżda deċiż *a priori*. Eżempju ipotetiku ta' tank ta' replika hu pprovdut fil-**Figura 1**. Jekk ikun hemm 20 marżebb li jibqgħu ħajjin f'tank partikolari meta l-ewwel individwu jilhaq l-istadju 62 ta' NF, għandhom jingħazlu ħames numri għal għarrieda minn 1-20. Il-marżebb #1 hu l-ewwel individwu li jilhaq l-istadju 62 ta' NF u l-marżebb #20 hu l-aħħar individwu f'tank li jilhaq l-istadju 62 ta' NF. Bl-istess mod, jekk ikun hemm 18-il larva li jibqgħu ħajjin f'tank, għandhom jintgħazlu ħames numri għal għarrieda minn 1-18. Dan għandu jsir għal kull tank ta' replika meta l-ewwel individwu fit-test jilhaq l-istadju 62 ta' NF. Jekk ikun hemm mortalitajiet matul l-ewwel kampjunar tal-istadju 62 ta' NF, il-kampjuni li jifdal iridu jerġgħu jintgħazlu b'mod aleatorju fuq il-baži ta' kemm-il larva jkun fadal fl-istadju <62 ta' NF u kemm-il kampjun iehor ikun meħtieġ biex jintlaħaq total ta' ħames kampjuni minn dik ir-replika. Fil-jum li fih marżebb jilhaq l-istadju 62 ta' NF, isir riferiment għaċ-ċart tal-kampjunar imhejjja biex jiġi determinat jekk dak l-individwu jiġix kampjunat jew fiżikament separat mill-imrieżeb li jifdal għall-esponiment issoktat. Fl-eżempju pprovdut (Figura 1), l-ewwel individwu li

jilhaq l-istadju 62 ta' NF (jigifieri l-kaxxa #1) jiġi separat fiżikament mill-larva l-oħra, jibqa' jiġi espost u jiġi registrat l-jum tal-istadju li fih dak l-individwu jkun laħaq l-istadju 62 ta' NF. Imbagħad, l-individwi #2 u #3 jiġu trattati bl-istess mod bħal #1 u mbagħad l-individwu #4 jiġi kampjunat għat-tkabbir u għall-istologija tat-tirojde (skont dan l-eżempju). Din il-proċedura tkompli sakemm l-20 individwu jissieheb mal-bqija tal-individwi ta' wara l-istadju 62 ta' NF jew inkella jiġi kampjunat. Il-proċedura għal għarrieda użata trid tagħti lil kull organizzmu tat-test probabbiltà ndaqs li jingħazel. Dan jista' jinkiseb billi jintuza kwalunkwe metodu ta' randomizzazzjoni, iżda jeħtieġ ukoll li kull marżebb jiġi nnettjat f'xi punt matul il-perjodu ta' subkampjunar tal-istadju 62 ta' NF.

Figura 1: Eżempju ipotetiku ta' reġim ta' kampjunar tal-istadju 62 ta' NF għal tank ta' replika wieħed.



42. Għas-subkampjunar tal-larva, il-punti ta' tmiem miksuba huma: (1) iż-żmien għall-istadju 62 ta' NF (jigifieri n-numru ta' jiem bejn il-fertilizzazzjoni u l-istadju 62 ta' NF), (2) l-anormalitajiet esterni, (3) il-morfometrika (eż. il-piż u t-tul) u (4) l-istologija tat-tirojde.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-imrieżeb

43. Is-subkampjun ta' mrieżeb tal-istadju 62 ta' NF (5 individwi għal kull replika) għandu jiġi ewtanizzat b'immersjoni għal 30 minuta f'ammonti xierqa (eż. 500 ml) ta' soluzzjoni anestetika (eż. soluzzjoni ta' 0,3 % MS-222, sulfonat tal-metan trikaina, CAS.886-86-2). Is-soluzzjoni ta' MS-222 għandha tiġi baferjata b'bikarbonat tas-sodju għal pH ta' bejn wieħed u ieħor 7,0 għaliex is-soluzzjoni mhux baferrjata ta' MS-222 hi aċiduża u irritanti għall-ġilda taż-żringijiet u tirriżulta f'assorbiment batut u għal stress addizzjonali żejjed għall-organizmi.
44. Bl-użu ta' kopp bil-malji, marżebb jitneħħa mill-kompartiment sperimentali u jiġi trasportat (jitqiegħed) fis-soluzzjoni tal-ewtanażja. L-animall jiġi ewtanizzat kif xieraq u jkun lest għan-nekroskopija meta ma jkunx risponsiv għal stimoli esterni bħall-qris tal-estremità ta' wara b'par forċipi.

Morfometrika (il-piż u t-tul)

45. Il-kejljiet tal-piż imxarrab (l-eqreb mg) u t-tul mill-imnieher sal-bokka (SVL) (l-eqreb 0,1 mm) għal kull marżebb għandhom isiru eżatt wara li ma jibqax risponsiv b'anestetiku

(Figura 2a). Jista' jintuża softwer ta' analiżi tal-immaġinijiet biex jitkejjel l-SVL minn ritratt. L-imrieżeb għandhom jiġu xxottati b'taptip qabel l-użin biex jitneħħa l-ilma aderenti żejjed. Wara li jittieħdu l-kejljiet tal-qies tal-ġisem (piż u SVL), kwalunkwe anormalità morfoloġika ċara u/jew sinjal kliniku ta' tossiċità bħal skoljozi (ara l-Appendiċi 8), għandhom jiġu reġistrati jew innotati t-tbenġil u l-emorraġiji, u hi rakkomandata dokumentazzjoni diġitali. Kun af li t-tbenġil hu emorraġiji żgħar ħomor jew vjola fil-kapillari tal-ġilda.

Il-Ġbir u l-Fissazzjoni tat-Tessuti

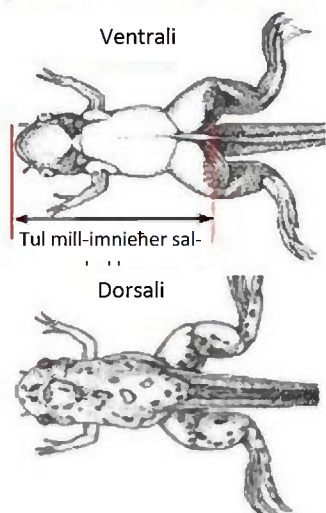
46. Għas-subkampjun tal-larva, il-glandoli tat-tirojde jiġu vvalutati għall-istoloġija. It-torso inferjuri wara l-estremityajiet ta' quddiem jitneħħa u jintrema. Il-karkassa mirquma tiġi fissata f'fissattiv ta' Davidson. Il-volum tal-fissattiv fil-kontenitur għandu jkun tal-anqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. Għandha tinkiseb aġitazzjoni jew ċirkolazzjoni xierqa tal-fissattiv biex it-tessuti ta' interess jiġu fissati b'mod adegwat. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson għal tal-anqas 48 siegħa, iżda mhux għal aktar minn 96 siegħa, meta jitlaħħu f'ilma dejonizzat u jinħażnu f'10 % formalina baferjata newtrali (1) (29).

Istoloġija tat-tirojde

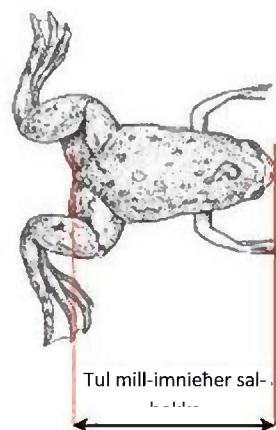
47. Kull subkampjun tal-larva (tessuti fissati) jiġi valutat istoloġikament għall-glandoli tat-tirojde, jiġifieri djanjozi u gradazzjoni tas-severità (29) (30).

Figura 2: Il-punti ta' riferiment għall-kejl tat-tul mill-imnieher sal-bokka għal-LAGDA fl-Istadju 62 ta' NF (a) u għaž-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru (b). Il-karatteristiċi definittivi tal-istadju 62 ta' NF (a): ir-ras tkun l-istess wisgħa tal-ġisem, it-tul tal-nerv olfattiv ikun iqsar mid-dijametru tal-bulb olfattiv (perspettiva dorsali), u l-estremityajiet ta' quddiem ikunu fil-livell tal-qalb (perspettiva ventrali). Stampi adattati minn Nieuwkoop u Faber (1994).

a. Subkampjunar tal-larva (stadju 62 ta' NF)



b. Kampjunar taż-żringijiet li



Tmiem l-esponiment tal-larva

48. Fid-dawl tan-numru inizjali ta' mrieżeb, hu mistenni li aktarx li jkun hemm percentwal żgħir ta' individwi li ma jiżviluppawx normalment u ma jlestux il-metamorfożi (stadju 66 ta' NF) f'ammont raġonevoli ta' żmien. Il-porzjon tal-larva tal-esponiment ma għandux jaqbeż is-70 jum. Kwalunkwe marżebb li jifdal fi tmiem dan il-perjodu għandu jiġi ewtanizzat (ara l-para. 43), jitkejlu l-piż imxarrab u l-SVL tiegħu, jitqassam fl-istadju skont Nieuwkoop u Faber, 1994, u għandha tittiehed nota ta' kwalunkwe anormalità fl-iżvilupp.

Qtil wara l-istadju 66 ta' NF

49. Ghaxar individwi għal kull tank għandhom ikomplu mill-istadju 66 ta' NF (risorbiment tad-denb shih) sat-terminazzjoni tal-esponiment. Għaldaqstant, wara li l-annimali kollha jilhaqu l-istadju 66 ta' NF jew wara 70 jum (skont liema jsehh l-ewwel), għandu jsir il-qtil. Wara l-istadju 66 ta' NF l-annimali li ma jkunux ser ikomplu l-esponiment għandhom jintgħażlu b'mod aleatorju.

50. L-annimali li ma jintgħāzlux għall-esponiment issoktat jiġu ewtanizzati (ara l-para. 43). Għal kull annimali isiru l-kejljiet tal-istadju tal-iżvilupp, tal-piż imxarrab u tal-SVL (Figura 2b) u nekroskopija grossa. Is-sess fenotipiku (fuq il-bażi tal-morfologija tal-gonadi) jiġi notat bħala femminili, maskili, jew indeterminat.

Kampjunar taż-Żringijiet li Jkunu Għadhom Qed Jikbru

Spjegazzjoni tal-kampjunar taż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru

51. L-animali li jifdal ikomplu bl-esponiment sa 10 ġimġhat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni (u/jew il-kontroll b'solvent jekk rilevanti). Wara tmiem il-perjodu ta' esponiment, l-animali li jifdal (massimu ta' 10 żringijiet għal kull replika) jiġu ewtanizzati, u d-diversi punti ta' tmiem jitkejlu jew inkella jiġu evalwati u reġistrati: (1) il-morfometrika (piż u tul), (2) il-proporzjonijiet tas-sess fenotipiku/genotipiku, il-piż tal-fwied (Indiċi Somatiku tal-Fwied), (4) l-istopatoloġija (gonadi, kanali riproduttivi, fwied u kilwa) u, mhux bilfors, (5) il-VTG fil-plażma.

Il-qtil bl-ewtanażja tal-imrieżeb

52. Il-kampjuni ta' żringijiet postmetamorfiki li jkunu għadhom qed jikbru jiġu ewtanizzati b'injezzjoni intraperitoneali ta' anestetiku, eż. 10 % MS-222 f'soluzzjoni baferjata tal-fosfat xierqa. Iż-żringijiet jistgħu jiġu kampjunati wara li ma jibqgħux responsivi (normalment madwar 2 min wara l-injezzjoni, jekk jituża 10 % MS-222 f'dożaġġ ta' 0,01 ml għal kull g żring). Filwaqt li ż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru jistgħu jitgħaddsu f'konċentrazzjoni oġġla ta' anestetiku (MS-222), l-esperjenza wriet li dawn jieħdu aktar żmien biex jiġu anestetizzati bl-użu ta' dan il-metodu u d-durata jaf ma tkunx adegwata biex tippermetti għall-kampjunar. L-injezzjoni tipprovdi ewtanażja effiċjenti u veloċi qabel il-kampjunar. Il-kampjunar ma għandux jinbeda sakemm jiġi kkonfermat in-nuqqas ta' responsività taż-żringijiet biex jiġi żgurat li l-animali jkunu mejtin. Jekk iż-żringijiet ikunu qed juru sinjali ta' tbatija konsiderevoli (serji ħafna u mewt jistgħu jitbassru b'mod affidabbli) u jitqiesu moribundi, l-animali għandhom jiġu anestetizzati u ewtanizzati u trattati bħala mortalità għall-analiżi tad-data. Meta żring jiġi ewtanizzat minhabba morbidità, dan għandu jiġi notat u rapportat. Skont meta ż-żring jiġi ewtanizzat matul l-istudju, iż-żring jista' jinżamm għall-analiżi tal-istopatoloġija (iffissar taż-żring għall-istopatoloġija possibbli).

Morfometrika (il-piż u t-tul)

53. Il-kejljiet tal-piż imxarrab u tal-SVL (Figura 2b) huma identiċi għal daww spjegati għas-subkampjunar tal-larva.

VTG fil-plażma (fakultattiva)

54. Il-VTG hi bijomarkatur aċċettat b'mod ġenerali li jirriżulta mill-esponiment għal sustanzi kimiċi estrogeniċi. Għal-LAGDA, il-VTG fil-plażma tista' titkejjel, iżda mhux bilfors, fi hdan kampjuni ta' żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru (din tista' tkun partikolarment rilevanti jekk is-sustanza kimika tat-test tkun suspettata li tkun estrogenu).
55. L-estrematajiet ta' wara taż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru jinqatgħu u d-demmm jingabar b'kapillari eparinizzata (għalkemm jistgħu jkunu xierqa metodi alternattivi għall-ġbir tad-demmm, bħat-titqib kardijaku). Id-demmm jinheles f'tubu tal-mikrocentrifugu (eż. volum ta' 1,5 ml) u jiġi ċentrigat biex tinkiseb il-plażma. Il-kampjuni tal-plażma

għandhom jinħażnu f'70 °C jew anqas sad-determinazzjoni tal-VTG. Il-konċentrazzjoni tal-VTG fil-plażma tista' titkejjel b'metodu ta' assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiċu (ELISA) (Appendiċi 6), jew b'metodu alternattiv bħall-ispettrometrija tal-massa (31). Antikorpi speċifiċi tal-ispeċijiet huma preferuti minhabba sensittività akbar.

Determinazzjoni tas-sess ġenetiku

56. Is-sess ġenetiku ta' kull żring li jkun għadu qed jikber jiġi vvalutat fuq il-bażi tal-markaturi żviluppati minn Yoshimoto *et al.* (11). Biex jiġi determinat is-sess ġenetiku, porzjon (jew biċċa sħiħa) ta' estremità wahda ta' wara (jew kwalunkwe tessut ieħor) imneħhi matul id-dissezzjoni jingabar u jinħażen f'tubu tal-mikrocentrifugazzjoni (kampjuni tat-tessut miż-żringijiet jistgħu jinkisbu minn kwalunkwe tessut). It-tessut jista' jinħażen f'20°C jew anqas sal-iżolament tal-aċidu nukleiku deossiribożi (DNA). L-iżolament tad-DNA mit-tessuti jista' jsir b'kits kummerċjalment disponibbli u l-analiżi għall-preżenza jew għall-assenza tal-markatur issir b'metodu ta' reazzjoni katina bil-polimerażi (PCR) Appendiċi 5). Ġeneralment, il-konkordanza bejn is-sess istoloġiku u l-ġenotip fost l-animalli tal-kontroll fil-punt ta' żmien tal-kampjuanr taż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru fil-gruppi tal-kontroll tkun ta' aktar minn 95 %.

Il-ġbir u l-fissazzjoni tat-tessuti għall-istopatoloġija

57. Il-gonadi, il-kanali riproduttivi, il-kliwi u l-fwied jingabru għall-analiżi istoloġika matul il-kampjunar finali. Tinfetħ il-kavità tal-addome, u l-fwied jiġi dissezżjonat u jintiżen. Imbagħad, l-organi diġestivi (eż. l-istonku, l-intestini) jitneħhew bir-reqqa mill-addome inferjuri biex jinkixfu l-gonadi, il-kliwi u l-kanali riproduttivi. Għandha tiġi nnotata kwalunkwe anormalità morfoloġika gross fil-gonadi. Finalment, l-estremitajiet ta' wara għandhom jitneħhew jekk ma jkunux tneħhew qabel għall-ġbir tad-dem. Il-fwied miġbur u l-karkassa bil-gonadi mħallija *in situ* għandhom jitqiegħdu f'fissattiv ta' Davidson minnufih. Il-volum tal-fissattiv fil-kontenitur għandu jkun tal-anqas 10 darbiet daqs il-volum approssimat tat-tessuti. It-tessuti kollha jibqgħu f'fissattiv ta' Davidson għal tal-anqas 48 siegħa, iżda mhux għal aktar minn 96 siegħa, meta jitlaħalhu f'ilma dejonizzat u jinħażnu f'10 % formalina baferjata newtrali (1) (29).

Istopatoloġija

58. Kull kampjun ta' żringijiet żgħar li jkunu għadhom qed jikbru jiġi evalwat istoloġikament għall-patoloġija fil-gonadi, fil-kanali riproduttivi, fil-kliwi u fit-tessut tal-fwied, jiġifieri djanjożi u gradazzjoni tas-severità (32). Il-fenotip tal-gonadi jinkiseb minn din l-evalwazzjoni wkoll (eż. l-ovarju, it-testikoli, l-interess), u flimkien mal-kejljiet individwali tas-sess ġenetiku, dawn l-osservazzjonijiet jistgħu jintużaw biex jiġu kkalkolati l-proporzjonijiet tas-sess fenotipiku/ġenotipiku.

RAPPORTAR TAD-DATA

Analizi statistika

59. Il-LAGDA jiġġenera tliet forom ta' *data* li jridu jiġu analizzati statistikament: (1) *data* kontinwa kwantitattiva (piż, SVL, LSI, VTG), (2) id-*data* dwar iż-żmien sal-avveniment għar-rati ta' żvilupp (jiġifieri jiem sal-istadju 62 ta' NF mit-tnedija tal-assaġġ) u (3) id-*data* ordinali fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew tal-istadji tal-iżvilupp mill-evalwazzjonijiet tal-istopatoloġija.
60. Hu rakkomandat li d-disinn tat-test u l-għażla tat-test statistiku jippermettu saħħa adegwata li jiġu individwati tibdiliet ta' importanza bijoloġika f'punti ta' tmiem fejn trid tiġi rapportata NOEC jew ECx. Idealment, l-analizijiet statistiċi tad-*data* (ġeneralment, replika tfisser bażi) għandhom isegwu l-proċeduri deskritti fid-dokument dwar l-Approċċi Kurrenti fl-Analizi Statistika tad-Data dwar l-Ekotossicità: Gwida għall-Applikazzjoni (33). L-Appendiċi 7 ta' dan il-metodu ta' ttestjar jipprovdi s-sigra tad-deċiżjonijiet tal-analizi statistika u gwida rakkomandati għat-trattament tad-*data* u fl-għażla tal-aktar test jew mudell statistiku xieraq li għandu jintuża fil-LAGDA.
61. Id-*data* mill-kampjunar taż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru (eż., tkabbir, LSI) għandha tiġi analizzata għal kull sess ġenotipiku b'mod separat peress li s-sess ġenotipiku jiġu determinat għaž-żringijiet kollha.

Kunsiderazzjonijiet għall-analizi tad-*data*

Użu ta' repliki u ta' trattamenti kompromessi

62. Repliki u trattamenti jistgħu jsiru kompromessi minnhabba mortalità eċċessiva minn tossicità ċara, minn mard jew minn errur tekniku. Jekk trattament ikun kompromess minn marda jew minn errur tekniku, għandu jkun hemm tliet trattamenti mhux kompromessi bi tliet repliki mhux kompromessi disponibbli għall-analizi. Jekk isseħħ tossicità ċara fit-trattament(i) għoli/għoljin, idealment ikun hemm tal-anqas tliet livelli ta' trattament bi tliet repliki mhux kompromessi disponibbli għall-analizi (konsistenti mal-approċċ tal-Konċentrazzjoni Massima Tollerata għal-linji gwida tat-test tal-OECD (34)). Minbarra l-mortalità, sinjali ta' tossicità ċara jistgħu jinkludu effetti fuq l-imġiba (eż. żamma fil-wiċċ, tluq fil-qiegh tat-tank, għawm invertit jew irregolari, nuqqas ta' attività ta' tluġh fil-wiċċ), leżjonijiet morfoloġiċi (eż. leżjonijiet emorragiċi, edema addominali) jew inibizzjoni ta' risponsi normali tat-tagħlif meta mqabbla b'mod kwalitattiv ma' annimali tal-kontroll.

Kontrolli tas-solvent

63. Fit-terminazzjoni tat-test, għandha ssir evalwazzjoni tal-effetti potenzjali tas-solvent (jekk jintuża). Dan isir permezz ta' paragun statistiku tal-grupp ta' kontroll b'solvent u l-grupp ta' kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. L-aktar punti ta' tmiem relevanti li jridu jiġu kkunsidrati f'din l-analizi huma d-determinanti tat-tkabbir (piż u tul), peress li dawn

jistgħu jkunu affettwati permezz ta' tossiċitajiet ġeneralizzati. Jekk jinstabu differenzi statistikament sinifikanti f'dawn il-punti ta' tmiem bejn il-gruppi tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni u tal-kontroll b'solvent, għandu jintuża l-aħjar ġudizzju professjonali biex jiġi determinat jekk il-validità tat-test hix f'riskju. Jekk iż-żewġ kontrolli jvarjaw, it-trattamenti esposti għas-sustanza kimika għandhom jitqabblu mal-kontroll b'solvent sakemm ma jkunx magħruf li jkun preferut it-tqabbil mal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni. Jekk ma jkun hemm ebda differenza statistikament sinifikanti bejn iż-żewġ gruppi tal-kontroll, hu rakkomandat li t-trattamenti esposti għas-sustanza kimika tat-test jitqabblu mar-raggruppati (gruppi tal-kontroll b'solvent u bl-ilma ta' dilwizzjoni), sakemm ma jkunx magħruf li t-tqabbil mal-grupp tal-kontroll bl-ilma ta' dilwizzjoni jew tal-kontroll b'solvent biss hu preferut.

Rapport tat-test

64. Ir-rapport tat-test għandu jinkludi dan li ġej:

Sustanza kimika tat-test:

- L-għamla fiżika u, fejn rilevanti, il-proprjetajiet fiżjokimiċi;
- Sustanza monokostitwenti:
 - id-dehra fiżika, is-solubbiltà fl-ilma, u l-proprjetajiet fiżjokimiċi rilevanti addizzjonali;
 - identifikazzjoni kimika, bħall-isem IUPAC jew CAS, numru CAS, kodiċi SMILES jew InChi, formula strutturali, purità, identità kimika tal-impurità bħala xieraq u prattikament fattibbli, eċċ. (inkluż il-kontenut tal-karbonju organiku, jekk xieraq).
- Sustanza multikostitwenti, UVCBs u tahlitiet:
 - ikkaratterizzati sa fejn possibbli mill-identità kimika (ara aktar 'il fuq), l-okkorrenza kwantitattiva u l-proprjetajiet fiżjokimiċi rilevanti tal-kostitwenti.

Speċijiet tat-test:

- L-isem xjentifiku, ir-razza jekk disponibbli, is-sors u l-metodu tal-ġbir tal-bajd fertilizzat, u l-immaniġġjar sussegwenti.
- L-inċidenza tal-iskoljozi f'kontrolli storiċi għall-koltura ewlenija użata.

Il-kundizzjonijiet tat-test:

- Il-fotoperjodu/i;
- Id-disinn tat-test (eż. id-daqs tal-kompartiment, il-materjal u l-volum tal-ilma, in-numru ta' kompartimenti u ta' repliki tat-test, in-numru ta' organiżmi għal kull replika);

- Il-metodu ta' thejjija 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 ta' dilwizzjoni: il-pH, l-ebusija, it-temperatura, il-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt, il-livelli tal-kloru residwu (jekk jitkejjel), il-karbonju organiku totali (jekk jitkejjel), il-jodju totali, is-solidi sospizi (jekk jitkejlu), is-salinità tal-medium tat-test (jekk titkejjel) u kwalunkwe kejl ieħor li jsir;
- Il-konċentrazzjonijiet nominali tat-test, il-medji tal-valuri mkejla u d-devjazzjonijiet standard tagħhom;
- Il-kwalità tal-ilma fir-reċipjenti tat-test, il-pH, it-temperatura (ta' kuljum) u l-konċentrazzjoni tal-ossiġenu dissolt;
- Informazzjoni dettaljata dwar it-tagħlif (eż. it-tip ta' ikel, is-sors, l-ammont mogħti u l-frekwenza).

Ir-riżultati:

- Evidenza li l-kontrolli ssodisfaw il-kriterji ta' validità;
- Id-*data* għall-kontroll (flimkien mal-kontroll b'solvent meta jintuża) u għall-gruppi tat-trattament kif ġej: il-mortalità u l-anormalità osservati, iż-żmien sal-istadju 62 ta' NF, il-valutazzjoni tal-istoloġija tat-tirojde (kampjun tal-larva biss), it-*tkabbir* (il-piż u t-tul), LSI (kampjun ta' żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss), il-proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku (kampjun ta' żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss), ir-riżultati tal-valutazzjoni tal-istopatoloġija għall-gonadi, għall-kanali riproduttivi, għall-kilwa u għall-fwied (kampjun taż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss) u l-VTG fil-plażma (kampjun taż-żringijiet li jkunu għadhom qed jikbru biss, jekk issir);
- L-approċċ għall-analiżi statistika u għat-trattament tad-*data* (it-testijiet statistiċi u l-mudelli użati);
- Il-konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) għal kull rispons ivvalutat;
- Il-konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) għal kull rispons ivvalutat ($f^{\circ}\alpha = 0,05$); L-ECx għal kull rispons ivvalutat, jekk applikabbli, u l-intervalli ta' kunfidenza (eż. 95 %) u graff tal-mudell imdahhal għall-kalkolu tagħha, il-pendil tal-kurva konċentrazzjoni

rispons, il-formula tal-mudell ta' rigressjoni, il-parametri stmati tal-mudell u l-erruri standard tagħhom.

- Kwalunkwe devjazzjoni mill-metodu ta' ttestjar u devjazzjoni mill-kriterji ta' aċċettazzjoni, u kunsiderazzjonijiet tal-konsegwenzi potenzjali fuq l-eżitu tat-test.

65. Għar-riżultati tal-kejljiet tal-punti ta' tmiem, għandhom jiġu ppreżentati l-valuri medji u d-devjazzjonijiet standard tagħhom (kemm fuq bażi ta' repliki kif ukoll fuq bażi ta' konċentrazzjoni, jekk possibbli).
66. Iż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-kontrolli għandu jiġi kkalkolat u ppreżentat bħala l-medja tal-medjani tar-repliki u d-devjazzjoni standard tagħhom. Bl-istess mod, għat-trattamenti, medjan tat-trattament għandu jiġi kkalkolat u ppreżentat bħala l-medja tal-medjani tar-repliki u d-devjazzjoni standard tagħhom.

DOKUMENTAZZJONI

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (3) Nieuwkoop PD u Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, l-Istati Uniti.
- (4) Kloas W u Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.
- (7) Villalpando I u Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S u Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.
- (9) Mikamo K u Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K u Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T u Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S u Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J u Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR u Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A u Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, I-Istati Uniti.
- (17) Il-Kapitolu C.4 ta' dan l-Anness, It-Test Bijodegradabbiltà Lesta.
- (18) Il-Kapitolu C.29 ta' dan l-Anness, Il-Bijodegradabbiltà Lesta - CO₂ f'recipjenti ssigillati (Test tal-Ispazju Vojt Fuqani).
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL u Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ u Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, l-Istati Uniti.
- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Ir-Renju Unit, 84 pp.
- (25) Il-Kapitolu C.38 ta' dan l-Anness, Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Anfibji.
- (26) Il-Kapitolu C.48 ta' dan l-Anness: Assaġġ dwar ir-Riproduzzjoni Fuq Terminu Qasir tal-Ħut.
- (27) Il-Kapitolu C.41 ta' dan l-Anness, Test tal-Iżvilupp Sesswali tal-Ħut.
- (28) Il-Kapitolu C.49 ta' dan l-Anness, Ħut, Test tat-Tossiċità Akuta fuq l-Embrijuni tal-Ħut (FET).
- (29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC u Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG u Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organizzazzjoni għall-Kooperazzjoni u l-Iżvilupp Ekonomiċi, Pariġi.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

Appendiċi 1

DEFINIZZJONIJIET

Punt ta' tmiem apikali: Li jikkawża effett fil-livell tal-popolazzjoni.

Sustanzi kimiċi: Sustanza jew tahlita

ELISA: Assaġġ ta' Immunoassorbiment Enzimatiku

EC_x: (Konċentrazzjoni effettiva għal effett ta' x %) hi l-konċentrazzjoni li tikkawża x % ta' effett fuq l-organizmi tat-test f'perjodu ta' esponiment partikolari meta mqabbla ma' kontroll. Pereżempju, EC₅₀ hi konċentrazzjoni stmata li tikkawża effett fuq il-punt ta' tmiem l-ittestjar f'50 % ta' popolazzjoni esposta fuq perjodu ta' esponiment definit.

dpf: Jiem wara l-fertilizzazzjoni

Test bi fluss kontinwu: Test bi fluss kontinwu ta' soluzzjonijiet tat-test fis-sistema tat-test matul id-durata tal-esponiment.

Assi HPG: assi ipotalamika-pitwitarja-gonadali

IUPAC: Unjoni Internazzjonali tal-Kimika Pura u Applikata.

Konċentrazzjoni bl-inqas effett osservat (LOEC) hi l-anqas konċentrazzjoni ttestjata ta' sustanza kimika tat-test li fiha tiġi osservata s-sustanza kimika biex ikollha effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$) meta mqabbla mal-kontroll. 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 ssodisfati, għandha tingħata spjegazzjoni shiha dwar kif intgħażlet l-LOEC (u għalhekk l-NOEC). L-Appendiċi 7 jipprovdu gwida.

Konċentrazzjoni Letali Medjana (LC₅₀): hi l-konċentrazzjoni ta' sustanza kimika tat-test li hi stmata li tkun letali għal 50 % tal-organizmi tat-test fid-durata tat-test.

Konċentrazzjoni bla effett osservat (NOEC) hi l-konċentrazzjoni tat-test immedjatament taħt l-LOEC, li meta mqabbla mal-kontroll, ma jkollha ebda effett statistikament sinifikanti ($p < 0,05$), f'perjodu ta' esponiment ddikjarat.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Sustanza kimika tat-test: Kwalunkwe sustanza jew tahlita li tkun qiegħda tiġi ttestjata permezz ta' dan il-Metodu ta' Ttestjar.

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

VTG: Vitelloġenina hi prekursor tal-fosfolipoglikoproteina għall-proteina fl-isfar tal-bajd li normalment isehħ f'nisa sesswalment attivi tal-ispeċijiet ovipari kollha.

Appendiċi 2**XI KARATTERISTIĊI KIMIĊI TA' ILMA TAD-DILWIZZJONI AĊĊETTABBLI**

Sustanza	Konċentrazzjoni ta' limitu
Materja partikulata	5 mg/l
Karbonju organiku totali	2 mg/l
Ammonijaka mhux jonizzata	1 µg/l
Kloru residwu	10 µg/l
Pestiċidi organofosforiċi totali	50 ng/l
Pestiċidi organokloru totali flimkien ma' poliklorobifenili	50 ng/l
Kloru organiku totali	25 ng/l
Aluminju	1 µg/l
Arseniku	1 µg/l
Kromu	1 µg/l
Kobalt	1 µg/l
Ram	1 µg/l
Ħadid	1 µg/l
ċomb	1 µg/l
Nikil	1 µg/l
Żingu	1 µg/l
Kadmju	100 ng/l
Merkurju	100 ng/l
Fidda	100 ng/l

Appendiċi 3

KUNDIZZJONIJIET TAT-TEST GĦAL-LAGDA

- | | |
|---|--|
| 1. Speċijiet tat-test | <i>Xenopus laevis</i> |
| 2. Tip ta' test | Bi fluss kontinwu, |
| 3. Temperatura tal-ilma | It-temperatura nominali hi ta' 21 °C. It-temperatura medja tul id-durata tat-test hi ta' 21 ± 1 °C (id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbu l-1,0 °C) |
| 4. Kwalità tal-illuminazzjoni | Bozoz fluworexxenti (spettru wiesa') 600-2000 lux (lumens/m ²) fis-superfiċje tal-ilma |
| 5. Fotoperjodu | 12-il siegħa dawl, 12-il siegħa dlam |
| 6. Volum tas-soluzzjoni tat-test u reċipjent tat-test (tank) | 4-10 l (fond minimu ta' 10–15 cm tal-ilma)
Tank tal-ħġieġ jew tal-azzar inossidabbli |
| 7. Volum tal-iskambji tas-soluzzjonijiet tat-test | Kostant, f'kunsiderazzjoni kemm taż-żamma tal-kundizzjonijiet bijoloġiċi kif ukoll tal-esponiment għas-sustanza kimika (eż. tiġdid tal-volum tat-tank għal hames darbiet kull jum) |
| 8. Età tal-organizmi tat-test fil-bidu | Stadju 8-10 ta' Nieuwkoop u Faber (NF) |
| 9. In-numru ta' organizmi għal kull replika | 20 annimal (embrijuni)/tank (replika) fil-bidu tal-esponiment u 10 annimali (li jkunu għadhom qed jikbru)/tank (replika) wara l-istadju 66 ta' NF sat-terminazzjoni tal-esponiment |
| 10. In-numru ta' trattamenti | Minimu ta' erba' trattamenti bis-sustanza kimika tat-test flimkien mal-kontroll(i) xieraq/xierqa |
| 11. In-numru ta' repliki għal kull trattament | Erba' repliki għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u 8 repliki għall-kontroll(1) |
| 12. In-numru ta' organizmi għal kull konċentrazzjoni tat-test | Minimu ta' 80 annimal għal kull trattament għas-sustanza kimika tat-test u minimu ta' 160 repliki għall-kontroll(1) |
| 13. Ilma ta' dilwizzjoni | Kwalunkwe ilma li jippermetti tkabbir u żvilupp normali ta' <i>X. laevis</i> (eż. ilma tan-nixxieġha jew ilma tal-vit iffiltrat bil-faħam) |
| 14. Ossigenazzjoni | Ebda meħtieġa, iżda l-ossigenazzjoni tat-tankijiet tista' tkun neċessarja jekk il-livelli ta' ossiġenu dissolt jonqsu anqas mil-limiti rakkomandati u ż-żidiet fil-fluss tas-soluzzjonijiet tat-test ikunu massimizzati. |
| 15. Ossiġenu dissolt tas-soluzzjoni | Ossiġenu dissolt: ≥ 40 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja jew $\geq 3,5$ |

tat-test	mg/l
16. Il-pH tas-soluzzjoni tat-test	6,5-8,5 (id-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti ma għandhomx jaqbżu iż-0,5)
17. L-ebusija u l-alkalinità tas-soluzzjoni tat-test	10-250 mg CaCO ₃ /l
18. Reġim tal-għalf	(Ara l-Anness 4)
19. Perjodu ta' esponiment	Mill-istadju 8-10 ta' NF sa għaxar ġimgħat wara ż-żmien medjan sal-istadju 62 ta' NF fil-grupp tal-kontroll bl-ilma u/jew b'solvent (massimu ta' 17-il ġimgħa)
20. Punti ta' tmiem bijoloġiċi	Il-mortalità (u dehriet anormali), iż-żmien sal-istadju 62 ta' NF (kampjun tal-larva), il-valutazzjoni tal-istoloġija tat-tirojde (kampjun tal-larva), it-tkabbir (il-piż u t-tul), l-indiċi somatiku tal-fwied (kampjun ta' żringġijiet li jkunu għadhom qed jikbru), il-proporzjonijiet tas-sess ġenetiku/fenotipiku (kampjun ta' żringġijiet li jkunu għadhom qed jikbru), l-istopatoloġija għall-gonadi, għall-kanali riproduttivi, għall-kilwa u għall-fwied (kampjun taż-żringġijiet li jkunu għadhom qed jikbru) u l-vitellogenina fil-plażma (kampjun taż-żringġijiet li jkunu għadhom qed jikbru, mhux obbligatorja);
21. Kriterji ta' validità tat-test	L-ossigenu dissolt għandu jkun ta' > 40 % tal-valur ta' saturazzjoni tal-arja; it-temperatura medja tal-ilma għandha tkun ta' 21 ± 1 °C u d-differenzjali bejn ir-repliki u bejn it-trattamenti għandhom ikunu < 1,0 °C; il-pH tas-soluzzjoni tat-test għandha tkun fil-medda ta' bejn 6,5 u 8,5; il-mortalità fil-kontroll għandha tkun ta' ≤ 20 % f'kull replika, u ż-żmien medju għall-istadju 62 ta' NF fil-kontroll għandu jkun ta' ≤ 45 jum; il-piż medju tal-organiżmi tat-test fl-istadju 62 tal-NF u fit-terminazzjoni tal-assaġġ fil-kontrolli u fil-kontrolli b'solvent (jekk użati) għandu jilhaq il-1,0 ± 0,2 u 11,5 ± 3 g, rispettivament; l-evidenza għandha tkun disponibbli biex jintwera li l-koncentrazzjonijiet tas-sustanza kimika tat-test fis-soluzzjoni jkunu nżammu b'mod sodisfaċenti bejn ± 20 % tal-valuri medji mkejlin.

Appendiċi 4

REĠIM TAL-GHALF

Ta' min jinnota li għalkemm dan ir-reġim tal-għalf hu rakkomandat, alternattivi huma possibbli dment li l-organizmi tat-test jikbru u jiżviluppaw b'rata xierqa.

Tagħlif tal-larva

Thejjija għad-dieta tal-larva

- A. 1:1 (v/v) Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin® (jew ekwivalenti) ;
1. Ikel tal-Bidu tat-Troti: ħallat 50 g Ikel tal-Bidu tat-Troti (granuli jew trab fini) u 300 ml ilma filtrat xieraq f'issettjar għoli tal-blender għal 20 sekonda
 2. Tahlita ta' algi/TetraFin® (jew ekwivalenti): ħallat 12-il g diski tal-alga spirulina u 500 ml ilma filtrat f'issettjar għoli tal-blender għal 40 sekonda, ħallat 12-il g Tetrafin® (jew ekwivalenti) ma' 500 ml ilma filtrat u mbagħad ħallathom biex tiffurma 1 L ta' 12-il g/l alga spirulina u 12-il g/l Tetrafin®(jew ekwivalenti)
 3. Għaqqad volumi ndaqs tal-Ikel tal-Bidu tat-Trodi mħallat u tat-tahlita ta' algi/Tetrafin®(jew ekwivalenti)
- B. Gamblu tal-ilma mielaħ:

15-il ml bajd tal-gamblu tal-ilma mielaħ jfaqqsu f'litru (1 l) ilma mielaħ (imhejji biż-żieda ta' 20 ml NaCl ma' litru (1) ilma dejonizzat). Wara ossigenazzjoni għal 24 siegħa f'temperatura ambjentali taħt dawl kostanti, il-gambli tal-ilma mielaħ jingabru. Għal ftit ħin, il-gambli tal-ilma mielaħ jithallew jissettjaw għal 30 min bit-twaqqif tal-ossigenazzjoni. Ċisti li jzommu fil-wiċċ tal-kannestru jitbattlu u jintremew, u l-gambli jitferrghu għal-filtri xierqa u jingiebu għal 30 ml bl-ilma filtrat.

Protokoll tat-Tagħlif

It-Tabella 1 tipprovdi referenza rigward it-tip u l-ammont ta' għalf użati matul l-istadji tal-larva tal-esponiment. L-annimali għandhom jintemghu tliet darbiet kull jum mit-Tnejn sal-Ġimgħa u darba kull jum fi tmiem il-ġimgħa.

Tabella 1: Ir-reġim tal-għalf għal-larva *X. laevis* f'kundizzjonijiet ta' fluss kontinwu

Żmien* (Wara l-Fertilizzazzjoni)	Ikel tal-Bidu tat-Troti: algi/TetraFin®(jew ekwivalenti)		Gamblu tal-Ilma Mielah	
	Matul il-ġimgħa (tliet darbiet kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)	Matul il-ġimgħa (darbtejn kull jum)	Tmiem il-ġimgħa (darba kull jum)
Jiem 4-14 (fil-Ġimgħat 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (mill-Jum 8 sa 15)	0,5 ml (mill-Jum 8 sa 15)

Ġimgha 2	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (mill-Jum 16)	1 ml (mill-Jum 16)
Ġimgha 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Ġimgha 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Ġimgha 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml
Ġimgha 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Ġimgha 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Ġimghat 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

* Il-Jum 0 hu definit bħala l-jum li fih issir l-injezzjoni tal-hCG.

Tranzizzjoni mid-dieta tal-larva għal dik ta' annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Hekk kif il-larva tlesti l-metamorfosi, tagħmel tranzizzjoni lejn formulazzjoni ta' dieta għal annimali li jkunu għadhom qed jikbru spjegata hawn taht. Filwaqt li tkun qed isseħħ din it-tranzizzjoni, id-dieta tal-larva għandha titnaqqas hekk kif jiżdied l-għalf għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru. Dan jista' jinkiseb billi jitnaqqas b'mod proporzjonat l-għalf għal-larva filwaqt li jiżdied b'mod proporzjonat l-għalf għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru hekk kif kull grupp ta' ħames imrieżeb jaqbeż l-istadju 62 ta' NF u joqrob lejn it-tlestija tal-metamorfosi fl-istadju 66 ta' NF.

Tagħlif tal-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Dieta għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Ladarba titlesta l-metamorfosi (stadju 66), ir-reġim tat-tagħlif jinbidel għal ikel taż-żringijiet primjm li jinżel fil-qiegħ ta' 3/32 pulzier (Xenopus Express™, FL, l-Istati Uniti), jew ekwivalenti.

Thejjija tal-gerbub imfarrak għat-tranzizzjoni mil-larva għall-annimali li jkunu għadhom qed jikbru

Il-gerbub tal-ikel taż-żringijiet li jinżel fil-qiegħ jingħadda fil-qosor minn mithan tal-kafè, minn blender jew minn mehrież u lida biex jitnaqqas id-daqs tal-gerbub b'bejn wieħed u ieħor 1/3. Proċessar twil wisq jirriżulta fi trab u mhuwiex imhegġegħ.

Protokoll tat-tagħlif

It-Tabella 2 tipprovdi referenza rigward it-tip u l-ammont ta' għalf użati matul l-istadji tal-annimali li jkunu għadhom qed jikbru u tal-ħajja adulta. L-annimali għandhom jintemgħu darba kull jum. Ta' min jinnota li hekk kif l-annimali jimmetamorfizzaw, dawn jibqgħu jircievu porzjon tal-gambli tal-ilma mielah sa > 95 % tal-metamorfosi kompluta tal-annimali.

L-animali ma għandhomx jingħataw għalf dakinhar tat-terminazzjoni tat-test biex l-għalf ma jfixkilx il-kejljiet tal-piż.

Tabella 2: Ir-regim tal-għalf għall-*X. laevis* li jkunu għadhom qed jikbru f'kundizzjonijiet ta' fluss kontinwu. Ta' min jinnota li l-animali mhux metamorfizzati, li jinkludu dawg li l-metamorfosi tagħhom tkun giet ittardjata mit-trattament kimiku, ma jistgħux jieklu gerbub mhux imfarrak.

Żmien (Ġimghat wara d-data medjana tal-metamorfosi)	Volum tal-gerbub imfarrak (mg għal kull żgħir taż-żring)	Volum tal-gerbub shih (mg għal kull żgħir taż-żring)
Hekk kif l-animali jlestu l-metamorfosi	25	0
Ġimghat 0-1	25	28
Ġimghat 2-3	0	110
Ġimghat 4-5	0	165
Ġimghat 6-9	0	220

* L-ewwel jum tal-Ġimgha 0 hi d-data medjana tal-metamorfosi fl-animali tal-kontroll.

Appendiċi 5

DETERMINAZZJONI TAS-SESS ĠENETIKU (TQASSIM SKONT IS-SESS ĠENETIKU)

Il-metodu ta' tqassim skont is-sess ġenetiku għal *Xenopus laevis* hu bbażat fuq Yoshimoto *et al.*, 2008. Il-proċeduri f'dettall dwar il-ġenotipar jistgħu jinkisbu minn din il-pubblikazzjoni, jekk ikun hemm bżonn. Jistgħu jintużaw metodi alternattivi (eż. qPCR bi throughput għoli) jekk jitqiesu xierqa.

Primers ta' *X. laevis*

Markatur tad-DM-W

'Il quddiem: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Kontra: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Kontroll Pozittiv

'Il quddiem: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Kontra: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purifikazzjoni tad-DNA

Ippurifika d-DNA mit-tessut tal-muskolu jew tal-ġilda bl-użu ta', eż., Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (kat # 69506) jew prodott simili skont l-istruzzjonijiet tal-kit. Id-DNA jista' jiġi elwit mill-kolonna dawwara bl-użu ta' anqas bafer biex jintrendew kampjuni aktar konċentrati jekk dawn jitqiesu neċessarji għall-PCR. Kun af li d-DNA hu pjuttost stabbli, u allura għandha tingħata attenzjoni biex tiġi evitata kontaminazzjoni kroċjata li tista' twassal għal karatterizzazzjoni hażina tal-irġiel bħala nisa, jew viċi versa.

PCR

Protokoll kampjun li juża JumpStart™ *Taq* mingħand Sigma hu spjegat fit-**Tabella 1**.

Tabella 1: Protokoll kampjun li juża JumpStart™ *Taq* mingħand Sigma

II-Master Mix	1x (µl)	[Finali]
NFW	11	-
10X Bafer	2,0	-

MgCl ₂ (25mM)	2,0	2,5 mM
dNTP's (10mM kull wiehed)	0,4	200 µM
Markatur għall-primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Primer kontra tal-markatur (8 µM)	0,8	0,3 µM
Kontroll għall-primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Primer kontra tal-kontroll (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unitajiet/µl
Mudell tad-DNA	1,0	~200 pg/µl

Nota: Meta jithejjew Master Mixes, hejji ż-żejda biex jikkompensaw għal kwalunkwe telf li jista' jseħh matul il-pipettar (eżempju: għandhom jintużaw 25x għal 24 reazzjoni biss).

Reazzjoni:

Il-Master Mix 19,0 µl

Mudell 1,0 µl

Total 20,0 µl

Profil Termociklatur:

Stadju 1. 94 °C 1 min

Stadju 2. 94 °C 30 sek

Stadju 3. 60 °C 30 sek

Stadju 4. 72 °C 1 min

Stadju 5. Mur għall-istadju 2. 35 ċiklu

Stadju 6. 72 °C 1 min

Stadju 7. 4 °C żomm

Prodotti tal-PCR jistgħu jintużaw minnufih f'gel jew jinħażnu f'4 °C.

Elettroforezi tal-Gel Agarożi (3 %)(protokoll kampjun)

50X TAE

Tris 24,2 g

Aċidu aċetiku glaċjali 5,71 ml

Na₂ (EDTA)·2H₂O 3,72 g

Żid l-ilma għal 100 ml

1X TAE

H₂O 392 ml

50X TAE 8 ml

3:1 Agarożi

3 partijiet agarożi NuSieve™ GTG™

parti (1) elettroendosmożi (EEO) baxxa agarożi Fisher

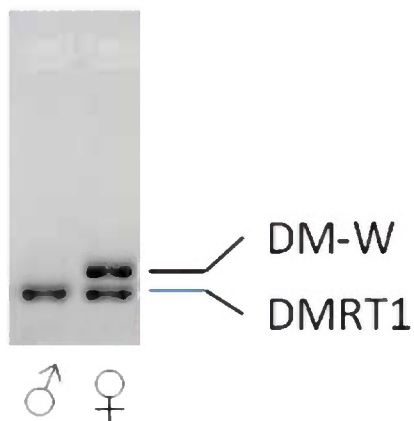
Metodu

1. Hejji ġel ta' 3 % billi żżid 1,2 g tahlita ta' agarożi ma' 43 ml 1X TAE. Hawwad biex tifred tagħqid kbir.
2. Ixhet it-tahlita tal-agarożi fil-microwave sakemm tinhall għalkollox (evita t-togħlija). Halliha tibred ftit.
3. Żid 1,0 µL bromur tal-etidju (10 mg/ml). Hawwad il-flask. Kun af li l-bromur tal-etidju hu mutageniku, allura, sa fejn possibbli, għandhom jintużaw sustanzi kimiċi alternattivi għal dan l-istadju biex jiġu minimizzati r-riskji għas-saħħa tal-ħaddiema¹.
4. Ferra' l-ġel f'forma b'mox. Halli jibred għalkollox.
5. Żid il-ġel fuq l-apparat. Iksi l-ġel b'1X TAE.
6. Żid 1 µl 6x kulurant tat-tgħabbija ma' kull 10 µl prodott tal-PCR.
7. Bil-pipetta ixhet kampjuni fil-bwejriet.
8. Haddem b'160 volt kostanti għal ~20 minuta.

Stampa tal-ġel tal-agarożi li turi l-mudelli tal-banda li jindikaw individwi maskili u femminili hi pprovduta fil-**Figura 1**.

¹ F'konformità mal-Artikolu 4.1 tad-Direttiva 2004/37/KE tal-Parlament Ewropew u tal-Kunsill tad-29 ta' April 2004 dwar il-protezzjoni tal-ħaddiema minn riskji relatati mal-esposizzjoni għal karċinoġeni jew mutageni fuq il-post tax-xogħol (Sitt Direttiva individwali fis-sens tal-Artikolu 16(1) tad-Direttiva tal-Kunsill 89/391/KEE) (ĠU L 158, 30.4.2004, p. 50).

Figura 1: Stampa tal-ġel tal-agarożi li turi l-mudell tal-banda li jindika individwu raġel (♂) (banda wahda ~203 bp: DMRT1) u ta' individwu mara (♀) (żewġ bandi f'~259 bp: DM-W u 203 bp:DMRT1).



DOKUMENTAZZJONI

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

Appendiċi 6

KEJL TAL-VITELLOĠENINA

Il-kejl tal-vitellogenina (VTG) isir bl-użu ta' metodu ta' assaġġ ta' immunoassorbiment enzimatiċu (ELISA) li oriġinarjament gie żviluppat għall-VTG tal-karpjun buras (Parks *et al.*, 1999). Bħalissa, ma hemm ebda antikorp kummerċjalment disponibbli għal *X. laevis*. Madankollu, fid-dawl tal-firxa kbira ta' informazzjoni għal din il-proteina u d-disponibbiltà tas-servizzi ta' produzzjoni kummerċjali kosteffikaċi tal-antikorpi, hu raġonevoli li l-laboratorji faċilment ikunu jistgħu jiżviluppaw ELISA biex jagħmlu dan il-kejl (Olmstead *et al.*, 2009). Barra minn hekk, Olmstead *et al.* (2009) jipprovdu wkoll deskrizzjoni tal-assaġġ kif modifikat għall-VTG f'*X. tropicalis*, kif muri hawn taħt. Il-metodu juża antikorp magħmul kontra l-VTG ta' *X. tropicalis*, iżda hu magħruf ukoll li jaħdem għall-VTG ta' *X. laevis*. Ta' min jinnota li jistgħu jintużaw ELISAs mhux kompetittivi wkoll, u li dawn jista' jkollhom limiti ta' detezzjoni inferjuri mill-metodu deskritt hawn taħt.

Materjali u reaġenti

- Serum tal-ewwel antikorp (Ab) preassorbit

Hallat parti (1) serum tal-1el Ab tal-VTG anti-*X. tropicalis* ma' 2 partijiet plazma tal-irġiel tal-kontroll u halli f'RT għal ~ 75 minuta, itfa' fuq is-silġ għal 30 min, iċċentrifuga > 20K x G għal siegħa (1) f'4 °C, neħhi s-supernatant, l-alikwota, u aħżen f'-20 °C.

- It-2ni Antikorp

Konjugat tal-IgG-HRP tal-Mogħoż Kontra l-Fniek (eż., Bio-Rad 172-1019)

- Standard tal-VTG

VTG purifikata ta' *X. laevis* fi 3,3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5' Tetrametil-benzidina) (eż., KPL 50-76-00; jew Sigma T0440)
- Serum Normali tal-Mogħoż (NGS) (eż., Chemicon® S26-100ml)
- Pjastri għall-mikrotitraġġ tal-polistiren tal-EIA b'96 bwejra (eż., ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35)
- form tal-ibridazzjoni ta' 37 °C (jew inkubatur tal-arja b'ekwilibrazzjoni veloċi) għall-pjastri, banjumarija għat-tubi
- Tagħmir, sustanzi kimiċi u provvisti komuni oħra tal-laboratorju.

Riċetti

Bafer tal-Kisi (50 mM Bafer tal-Karbonat, pH 9,6):

NaHCO₃ 1,26 g

Na₂CO₃ 0,68 g
 ilma 428 ml

10X PBS (0,1 M fosfat, 1,5 M NaCl):

NaH₂PO₄·H₂O 0,83 g
 Na₂HPO₄·7 H₂O 20,1 g
 NaCl 71 g
 ilma 810 ml

Bafer tal-Hasil (PBST):

10X PBS 100 ml
 ilma 900 ml

Aġġusta l-pH għal 7,3 b'1 M HCl, imbagħad żid 0,5 ml Tween-20

Bafer tal-Assaġġ:

Serum Normali tal-Mogħoż (NGS) 3,75 ml
 Bafer tal-Hasil 146,25 ml

Ġbir tal-kampjuni

Id-demmi jingabar b'tubu mikroermatokrit eparinizzat u jitqiegħed fuq is-silġ. Wara ċ-ċentrifugazzjoni għal 3 minuti, it-tubu jingħata punteġġ, jinkiser biex jinfetaħ, u l-plażma tinheles f'0,6 ml tubi mikroċentrifugi li jkun fihom 0,13 unitajiet ta' aprotinina lijoofilizzata. (Dawn it-tubi jithejjew minn qabel billi jiżdied l-ammont xieraq ta' aprotinina, iffriżar u lijoofilizzazzjoni fi speed-vac bi shana baxxa sakemm jinxfu.) Ahžen il-plażma f' -80 °C sakemm tiġi analizzata.

Proċedura għal pjastra waħda

Kisi tal-pjastra

Hallat 20 µl VTG purifikata ma' 22 ml bafer karbonat (3 µg/ml finali). Żid 200 µl ma' kull bwejra ta' pjastra b'96 bwejra. Għatti l-pjastra b'rita adeżiva tal-issigillar u halliha tinkuba matul il-lejl f'37 °C għal sagħtejn (jew 4 °C matul il-lejl).

Imblokkar tal-pjastra

Is-soluzzjoni tal-imlokkar tithejja billi jiżdiedu 2 ml Serum Normali tal-Mogħoż (NGS) ma' 38 ml bafer tal-karbonat. Nehhi s-soluzzjoni tal-kisi u xxotta bit-thawwid. Żid 350 µl tas-soluzzjoni tal-imblokkar f'kull bwejra.. Għatti b'rita adeżiva tal-issigillar u inkuba f'37 °C għal sagħtejn (jew f'4 °C matul il-lejl).

Thejjija tal-istandards

5,8 µl standard tal-VTG purifikata jithallat ma' 1,5 ml bafer tal-assaġġ f'tubu tat-test tal-ħgieġ li jintrema tal-borosilikat ta' 12 x 75 mm. Dan irendi 12 760 ng/ml. Imbagħad issir dilwizzjoni serjali billi jiżdiedu 750 µl tad-dilwizzjoni preċedenti ma' 750 µl bafer tal-assaġġ biex jinkisbu konċentrazzjonijiet finali ta' 12 760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100, u 50 ng/ml.

Thejjija tal-Kampjuni

Ibda b'dilwizzjoni ta' 1:300 (eż., għaqqad 1 µl plazma ma' 299 µl bafer tal-assaġġ) jew ta' 1:30 tal-plażma fil-bafer tal-assaġġ. Jekk ikun mistenni ammont kbir ta' VTG, jistgħu jkunu meħtieġa dilwizzjonijiet addizzjonali jew akbar. Ipprova żomm il-B/B₀ fi hdan il-medda tal-istandards. Għal kampjuni mingħajr VTG apprezzabbli, eż., irġiel u nisa tal-kontroll (li lkoll ikunu immaturi), uża d-dilwizzjoni ta' 1:30. Kampjuni dilwiti anqas minn hekk jistgħu juru effetti matriċi mhux mixtieqa.

Barra minn hekk, hu rakkomandat li tagħmel kampjun ta' kontroll pożittiv f'kull pjastra. Dan jiġi minn grupp ta' plazma li jkun fih livelli indotti hafna ta' VTG. Il-grupp għall-ewwel jiġi dilwit f'NGS, jiġi diviż f'alikwoti u jinħażen f'-80 °C. Għal kull pjastra, alikwota tithalla tinħall, tiġi dilwita aktar f'bafer tal-assaġġ u tintuża b'mod simili għal kampjun tat-test.

Inkubazzjoni bl-1el antikorp

L-1el Ab jithejja billi ssir dilwizzjoni ta' 1:2000 serum preassorbit tal-1el Ab f'bafer tal-assaġġ (eż., 8 µl għal 16 ml bafer tal-assaġġ). Għaqqad 300 8 µl tas-soluzzjoni tal-1el Ab ma' 300 µl tal-kampjun/tal-istandard f'tubu tal-ħgieġ. It-tubu B₀ jithejja b'mod simili bi 300 µl bafer tal-assaġġ u bi 300 µl antikorp. Barra minn hekk, għandu jithejja tubu NSB bl-użu ta' 600 µl bafer tal-assaġġ biss, jiġifieri ebda Ab. Għatti t-tubi b'Parafilm u vvortifikahom bil-galbu biex jithalltu. Inkubahom f'banjumarija ta' 37 °C għal siegħa (1).

Hasil tal-pjastra

Eżatt qabel ma titlesta l-inkubazzjoni tal-1el Ab, aħsel il-pjastra. Tagħmel dan billi thawwad il-kontenuti u tixxotta bit-taptip fuq karta assorbenti. Imbagħad imla l-bwejriet bi 350 µl soluzzjoni tal-ħasil, tbattal u tixxotta bit-taptip. Pipetta ripetitur b'diversi kanali jew ħassiel tal-pjastri jkunu siewja hawnhekk. L-istadju tal-ħasil jiġi ripetut darbtejn oħra għal total ta' tliet ħasliet.

Tgħabbija tal-pjastra

Wara li l-pjastra tkun maħsula, nehhi t-tubi mill-banjumarija u vvortifikahom bil-galbu. Żid 200 μ l minn kull kampjun, mill-istandard, mill- B_0 , u mit-tubu tal-NSB fil-bwejriet duplikati tal-pjastra. Għatti l-pjastra b'rita adeżiva tal-issigillar u halliha tinkuba għal siegħa (1) f'37 °C.

Inkubazzjoni bit-2ni antikorp

Fi tmiem l-inkubazzjoni mill-istadju preċedenti, il-pjastra għandha tinħasel tliet darbiet mill-ġdid, bħalma ntqal hawn fuq. It-2ni Ab dilwit jithejja bit-taħlit ta' 2,5 μ l tat-2ni Ab ma' 50 ml bafer tal-assaġġ. Żid 200 μ l tat-2ni Ab dilwit f'kull bwejra, issigilla bħalma ntqal aktar 'il fuq, u inkuba għal siegħa (1) f'37 °C.

Żieda tas-substrat

Wara li titlesta l-inkubazzjoni bit-2ni Ab, aħsel il-pjastra tliet darbiet kif deskritt aktar 'il fuq. Imbagħad żid 100 μ l substrat tat-TMB f'kull bwejra. Halli r-reazzjoni tipproċedi għal 10 minuti, idealment protetta minn dawl qawwi. Waqqaf ir-reazzjoni billi żżid 100 μ l ta' aċidu fosforiku 1 M. Dan ibiddel il-kulur minn blu għal isfar intens. Kejjel l-assorbanza f'450 nm billi tuża apparat li jkejjel il-pjastru.

Ikkalkola l-B/ B_0

Naqqas il-valur medju tal-NSB mill-kejljiet kollha. Il-B/ B_0 għal kull kampjun u għall-istandard jiġi kkalkolat bid-diviżjoni tal-valur tal-assorbanza (B) bl-assorbanza medja tal-kampjun tal- B_0 .

Ikseb il-kurva standard u ddetermina l-ammonti mhux magħrufa

Igġenera kurva standard bl-għajjnuna ta' xi softwer tal-grafika bil-kompjuter (eż., SlidewriteTM jew Sigma Plot[®]) li jestrapola l-kwantità mill-B/ B_0 ta' kampjun fuq il-bażi tal-B/ B_0 tal-istandards. Tipikament, l-ammont jiġi plottjat fuq skala tal-log u l-kurva jkollha forma sigmojde. Madankollu, jista' jidher lineari meta tintuża medda ristretta ta' standards. Ikkoreġi l-ammonti tal-kampjun għall-fattur ta' dilwizzjoni u rrapporta bħala VTG mg/ml tal-plażma.

Determinazzjoni tal-limiti minimi ta' detezzjoni (MDL)

Spiss, b'mod partikolari f'irġiel normali, mhux se jkun ċar kif tirrapporta r-rizultati minn valuri baxxi. F'dawn il-każijiet, għandhom jintużaw il-“Limiti ta' kunfidenza” ta' 95 % biex jiġi determinat jekk il-valur għandux jiġi rapportat bħala żero jew xi numru ieħor. Jekk ir-rizultat tal-kampjun ikun fi hdan l-intervall ta' kunfidenza tal-istandard żero (B_0), ir-rizultat għandu jkun rapportat bħala żero. Il-livell minimu ta' detezzjoni se jkun l-anqas standard li jkun konsistentement differenti mill-istandard żero; jiġifieri, iż-żewġ intervalli ta' kunfidenza ma jidhlux f'xulxin. Għal kwalunkwe rizultat tal-kampjun li jkun fi hdan il-limitu ta' kunfidenza tal-livell minimu ta' detezzjoni, jew oghla, jiġi rapportat il-valur ikkalkolat. Jekk kampjun jaqa' bejn l-istandard żero u l-intervalli tal-livell minimu ta'

detezzjoni, nofs il-livell minimu ta' detezzjoni ghandu jigi rapportat għall-valur ta' dak il-kampjun.

DOKUMENTAZZJONI

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

Appendiċi 7

ANALIŻI STATISTIKA

Il-LAGDA jiġġenera tliet forom ta' *data* li jridu jiġu analizzati statistikament: (1) *Data* kontinwa kwantitattiva, (2) *Data* dwar iż-żmien sal-avveniment għar-rati ta' żvilupp (Żmien sal-istadju 62 ta' NF) u (3) *Data* ordinali fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew tal-istadji tal-iżvilupp mill-evalwazzjonijiet tal-istopatoloġija. Is-sigra deċiżjonali tal-analiżi statistika rakkomandata għal-LAGDA hi murija fil-Figura 1. Barra minn hekk, ċerti annotazzjonijiet li jaf ikunu meħtieġa biex issir analiżi statistika għall-kejljiet mil-LAGDA huma indikati hawn taht. Għas-sigra deċiżjonali ta' analiżi, ir-riżultati tal-kejljiet għall-mortalità, għat-*tkabbir* (piż u tul) u għall-indiċi somatiku tal-fwied (LSI) għandhom jiġu analizzati skont il-fergħa "Punti ta' tmiem oħra".

Data kontinwa

Id-*data* għall-punti ta' tmiem kontinwi l-ewwel għandha tiġi verifikata għall-monotoniċità bit-trasformazzjoni tal-klassifikazzjoni tad-*data*, bit-tidħil f'mudell ANOVA u bit-tqabbil tal-kuntrasti lineari u kwadratiċi. Jekk id-*data* tkun monotoniċa, test ta' tendenza rigressiva ta' Jonckheere-Terpstra għandu jsir fuq il-medjani tar-repliki u ma għandha tiġi applikata ebda analiżi sussegwenti. Alternattiva għad-*data* li normalment tiġi distribwita b'varjanzi omogeni hi t-test ta' tendenza rigressiva ta' Williams. Jekk id-*data* ma tkunx monotoniċa (kuntrast kwadratiċu jkun sinifikanti u lineari ma jkunx sinifikanti), din għandha tiġi analizzata bl-użu ta' mudell ANOVA b'effetti mħallta. Imbagħad id-*data* għandha tiġi vvalutata għan-normalità (idealment bl-użu tat-test ta' Shapiro-Wilk jew ta' Anderson-Darling) u għall-omoġenità tal-varjanza (idealment bl-użu tat-test ta' Levene). Iż-żewġ testijiet isiru fuq ir-residwi mill-mudell ANOVA b'effetti mħallta. Jista' jintuża ġudizzju esperti minflok dawn it-testijiet formali għan-normalità u għall-omoġenità tal-varjanza, għalkemm it-testijiet formali huma ppreferuti. Jekk id-*data* jkollha distribuzzjoni normali bil-varjanza omogena, is-suppożizzjonijiet ta' ANOVA b'effett imħallat ikunu ssodisfati u jiġi determinat trattament sinifikanti mit-test ta' Dunnett. Meta tinstab nonnormalità jew eteroġenità tal-varjanza, is-suppożizzjonijiet tat-test ta' Dunnett ikunu nkisru u titfittex transform stabbilizzanti normalizzati tal-varjanza. Jekk ma jinstab ebda transform, effett ta' trattament sinifikanti jiġi determinat b'test ta' Dunn. Kull meta jkun possibbli, għandu jsir test b'denb wieħed għall-kuntrarju ta' test b'żewġ idnub, iżda jkun hemm bżonn ta' ġudizzju esperti biex jiġi determinat liem hu xieraq għal punt ta' tmiem partikolari.

Mortalità

Id-*data* dwar il-mortalità għandha tiġi analizzata għall-perjodu ta' żmien li jkopri t-test shih u għandha tiġi espressa bħala proporzjon li jkun miet fi kwalunkwe tank partikolari. Imrieżeb li ma jlestux il-metamorfożi fil-perjodu ta' żmien partikolari, daww l-imrieżeb li jkun fil-koorta tas-subkampjun tal-larva, daww iż-żringijiet li jkun għadhom qed jikbru li jinqatlu, u kwalunkwe animal li jmut minhabba errur min-naħa tal-esperimentatur għandhom jiġu trattati bħala *data* ċensurata u ma jiddaħħlux fid-denominatur tal-kalkolu

perċentwali. Qabel kwalunkwe analiżi statistika, il-proporzjonijiet tal-mortalità għandhom jiġu trasformati bl-għerq kwadrat arcsin. Alternattiva hi li jintuża t-test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage, possibilment b'agġustament ta' Rao-Scott fil-preżenza ta' dispersjoni eċċessiva.

Piż u tul (data dwar it-tkabbir)

L-irġiel u n-nisa ma jkunux sesswalment dimorfiċi matul il-metamorfożi u b'hekk id-*data* dwar it-tkabbir tas-subkampjunar tal-larva għandha tiġi analizzata b'mod indipendenti mill-ġeneru. Madankollu, id-*data* dwar it-tkabbir tal-annimali żgħar li jkunu għadhom qed jikbru għandha tiġi analizzata b'mod separat fuq il-bażi tas-sess ġenetiku. Trasformazzjoni tal-log tista' tkun meħtieġa għal dawn il-punti ta' tmiem peress li n-normalità tal-log tad-*data* dwar id-daqs mhix rari.

Indiċi somatiku tal-fwied (LSI)

Il-piżijiet tal-fwied għandhom jiġu normalizzati bħala proporzjonijiet tal-piżijiet tal-ġisem sħiħ (jiġifieri LSI) u jiġu analizzati b'mod separat fuq il-bażi tas-sess ġenetiku.

Żmien għall-istadju 62 ta' NF

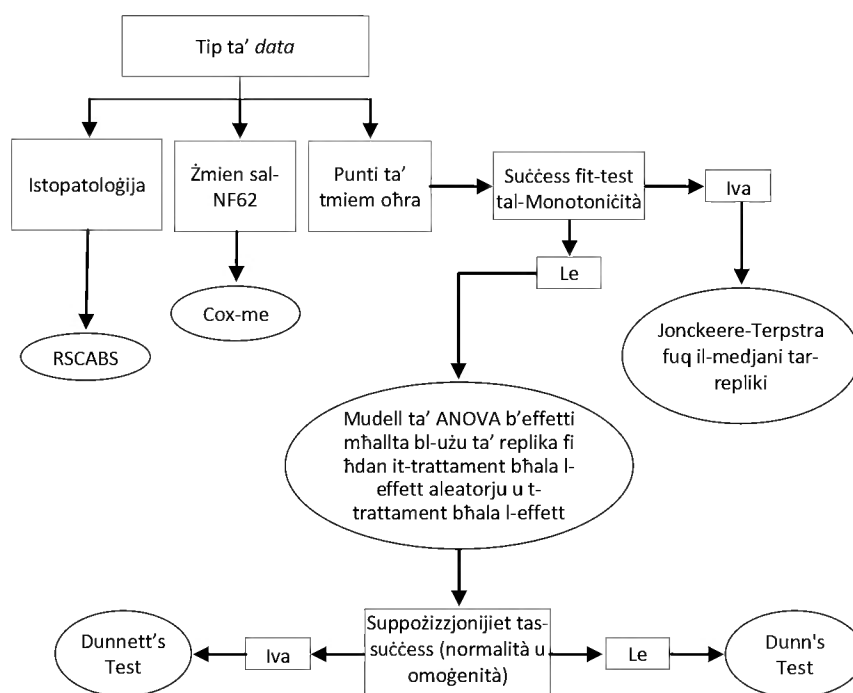
Id-*data* dwar iż-żmien għall-metamorfosi għandha tiġi trattata bħala *data* dwar iż-żmien sa avveniment, bi kwalunkwe mortalità jew individwu li ma jilhaqx l-istadju 62 ta' NF f'70 jum li jiġu trattati bħala *data* right-censored (jiġifieri l-valur veru jkun akbar minn 70 jum iżda l-istudju jintemm qabel ma l-annimal ikun laħaq l-istadju 62 ta' NF f'70 jum). Iż-żmien medja sat-tlestija tal-istadju 62 ta' NF tal-metamorfosi fil-kontrolli tal-ilma ta' dilwizzjoni għandu jintuża biex tiġi determinata d-*data* ta' terminazzjoni tat-test. Iż-żmien medjan sat-tlestija tal-metamorfosi jista' jiġi determinat bi stimaturi tal-limitu tal-prodott ta' Kaplan-Meier. Dan il-punt ta' tmiem għandu jiġi analizzat bl-użu ta' mudell tal-periklu proporzjonali ta' Cox b'effetti mħallta li jqis l-istruttura tar-repliki tal-istudju.

Id-*data* dwar l-istopatoloġija (punteġġi tas-severità u stadji tal-iżvilupp)

Id-*data* dwar l-istopatoloġija tkun fil-forma ta' punteġġi tas-severità jew ta' stadji tal-iżvilupp. Test imsejjaħ RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) juża test ta' tendenza rigressiva ta' Cochran-Armitage agġustat skont Rao-Scott f'kull livell ta' severità f'rispons tal-istopatoloġija (Green *et al.*, 2014). L-agġustament ta' Rao-Scott jinkorpora d-disinn sperimentali tar-reċipjent tar-replika fit-test. Il-proċedura "by Slices" tinkorpora l-aspettattiva bijoloġika li s-severità tal-effett għandha tendenza li tiżdied hekk kif jiżdiedu d-dożi jew il-konċentrazzjonijiet, filwaqt li jinżammu l-punteġġi tas-sugġetti individwali u tinstab is-severità ta' kwalunkwe effett misjub. Il-proċedura RSCABS ma tiddeterminax biss liema trattamenti jkunu statistikament differenti mill-kontrolli (jiġifieri jkollhom patoloġija aktar severa mill-kontrolli), iżda tiddetermina wkoll f'liema punteġġ tas-severità ssehh id-differenza u b'hekk tipprovdi kuntest ferm meħtieġ għall-analiżi. Fil-każ tal-għażla tal-istadji tal-iżvilupp tal-gonadi u tal-kanali riproduttivi, għandha tiġi applikata manipolazzjoni addizzjonali għad-*data* peress li suppożizzjoni tal-RSCABS hi li s-severità

tal-effett tizzied mad-doża. L-effett osservat jista' jdewwem jew ihaffef l-iżvilupp. Għaldaqstant, id-*data* dwar l-għażla tal-istadji tal-iżvilupp għandha tiġi analizzata kif rapportata biex tiġi individwata aċċelerazzjoni fl-iżvilupp u mbagħad tiġi invertita manwalment qabel ma ssr it-tieni analiżi biex jiġi individwat dewmien fl-iżvilupp.

Figura 1: Sigra deċiżjonali tal-analiżi statistika għad-*data* tal-LAGDA.



DOKUMENTAZZJONI

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

Appendiċi 8

KUNSIDERAZZJONIJIET GHAT-TRAČĊAR U GHALL-MINIMIZZAZZJONI TAL-OKKORRENZA TA' SKOLJOŽI

Skoljoži idjopatika, li normalment tidher bħala “denb mgħawweġ” f’imrieżeb tal-*Xenopus laevis*, tista’ tikkompjika l-osservazzjonijiet morfoloġiċi u tal-imġiba fil-popolazzjonijiet tat-test. Għandhom jitwettqu sforzi biex tiġi minimizzata jew eliminata l-inċidenza ta’ skoljoži, kemm fl-istokk kif ukoll fil-kundizzjonijiet tat-test. Fit-test definittiv, hu rakkomandat li l-prevalenza ta’ skoljoži moderata u severa tkun anqas minn 10 % biex titjeb il-kunfidenza li t-test ikun jista’ jindividwa effetti fuq l-iżvilupp relatati mat-trattament f’larva tal-anfibji li mill-bqija jkun f’saħħithom.

Osservazzjonijiet ta’ kuljum matul it-test definittiv għandhom jirreġistraw kemm l-inċidenza (għadd tal-individwi) kif ukoll is-severità tal-iskoljoži, meta tkun preżenti. In-natura tal-anormalità għandha tiġi deskritta fir-rigward tal-post (eż., quddiem jew wara l-bokka) u tad-direzzjoni tal-kurvatura (eż. latreali jew dorsali għal ventrali). Is-severità tista’ tiġi gradata kif ġej:

(NR) Mhux rimarkabbli: ebda kurvatura preżenti

(1) Minima: kurvatura laterali hafifa wara l-bokka; tidher biss waqt il-mistrieħ

(2) Moderata: kurvatura laterali wara l-bokka; viżibbli l-hin kollu iżda ma tinibixxi l-moviment

(3) Severa: kurvatura laterali quddiem il-bokka; JEW kwalunkwe kurvatura li tinibixxi l-moviment; JEW kwalunkwe kurvatura dorsali għal ventrali

Il-Bord Xjentifiku Konsultattiv tal- US EPA FIFRA (FIFRA SAP 2013) irrieżamina *data* sommarja għall-iskoljoži fi ħmistax-il Assaġġ tal-Metamorfosi tal-Anfibji b’*X. laevis* (stadju 51 sa 60+ ta’ NF) u pprovda rakkomandazzjonijiet ġenerali għat-tnaqqis tal-prevalenza ta’ din l-anormalità fil-popolazzjonijiet tat-test. Ir-rakkomandazzjonijiet huma rilevanti għal-LAGDA anki jekk dan it-test jinkludi perjodu ta’ żmien tal-iżvilupp itwal.

Prestazzjoni Storika tar-Riproduzzjoni

Generalment, adulti f’saħħithom ta’ kwalità għolja għandhom jintużaw bħala pari tat-tgħammir; l-eliminazzjoni ta’ pari tat-tgħammir li jipproduċu wlied bl-iskoljoži tista’ timminimizza l-okkorrenza tagħha maż-żmien. Speċifikament, il-minimizzazzjoni tal-użu ta’ stokk tat-tnissil maqbud fis-selvaġġ tista’ tkun ta’ benefiċċju. Il-perjodu ta’ esponiment tal-LAGDA jibda b’embrijuni tal-istadju 8 sa 10 ta’ NF, u mhuwiex fattibbli li jiġi determinat sa mill-bidu tat-test jekk l-individwi partikolari hux se jesibixxu skoljoži. B’hekk, minbarra t-traċċar tal-inċidenza ta’ skoljoži f’animali ttestjati, għandha tiġi

dokumentata l-prestazzjoni storika tal-klaċċ (inkluża l-prevalenza tal-iskoljożi fi kwalunkwe larva li tithalla tiżviluppa). Jista' jkun siewi li tkompli tiġi ssorveljata l-parti ta' kull klaċċ li ma tintużax fi studju partikolari u li dawn l-osservazzjonijiet jiġu rapportati (FIFRA SAP 2013).

Kwalità tal-ilma

Importanti li tiġi żgurata kwalità adegwata tal-ilma, kemm fl-istokk tal-laboratorju kif ukoll matul it-test. Minbarra l-kriterji tal-kwalità tal-ilma evalwati bħala rutina għal testijiet tat-tossiċità akkwatika, jista' jkun utli li jsiru monitoraġġ u korrezzjoni għal kwalunkwe insuffiċjenza ta' nutrijenti (eż., insuffiċjenza ta' vitamina Ċ, ta' kalċju, ta' fosfru) jew livelli eċċessivi ta' selenju u ta' ram, li huma rapportati li jikkawżaw skoljożi sa gradi varji f'*Rana* sp. u fi *Xenopus* sp. imrobbija fil-laboratorju (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; kif rapportat fil-FIFRA SAP 2013). L-użu ta' reġimen xieraq tad-dieta (ara l-Appendiċi 4), u t-tindif regolari tat-tank, ser itejbu b'mod ġenerali l-kwalità tal-ilma u s-saħħa tal-eżemplari tat-test.

Dieta

Rakkomandazzjonijiet speċifiċi għal reġimen djetetiku, li nstab li rnexxew fil-LAGDA, huma spjegati fl-Appendiċi 4. Hu rakkomandat li s-sorsi tat-tagħlif jiġu skrinjati għal tossini bijoloġiċi, għal erbiċidi, u għal pestiċidi oħra li huma maħrufa li jikkawżaw skoljożi f'*X. laevis* jew f'annimali akkwatiċi oħra (Schlenk u Jenkins 2013). Pereżempju, l-esponiment għal ċerti inibituri tal-kolinesterazi ġie assoċjat mal-iskoljożi fil-ħut (Schultz *et al.* 1985) u żringijiet (Bacchetta *et al.* 2008).

DOKUMENTAZZJONI

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, u G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, u R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, u J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, u D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraiez, u P. Herraiez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezii* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D., u Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. Minuti tal-US EPA FIFRA SAP Nru 2013-03. 21-23 ta' Mejju 2013. Washington, DC. ”