

«C. 47 Prova di tossicità sui pesci nei primi stadi di vita

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 210 (2013). Le prove effettuate sui pesci nei primi stadi di vita sono destinate a determinare gli effetti letali e subletali delle sostanze chimiche sulle specie in esame, nei suddetti stadi di sviluppo. Esse forniscono informazioni preziose per la valutazione degli effetti letali e subletali cronici della sostanza chimica in esame su altre specie di pesci.
2. La linea guida n. 210 si basa su una proposta del Regno Unito discussa durante una riunione di esperti dell'OCSE tenutasi a Medmenham (Regno Unito) nel novembre 1988 e nuovamente aggiornata nel 2013 per tenere conto dell'esperienza acquisita con il suo uso e delle raccomandazioni formulate nel corso di un seminario dell'OCSE sulle prove di tossicità dei pesci, tenutosi nel settembre 2010 (1).

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Si espongono i pesci nei primi stadi di vita a una serie di concentrazioni della sostanza chimica in esame disciolta in acqua. Sono da privilegiarsi condizioni a flusso continuo, ma, se non fossero possibili, si ammettono condizioni semistatiche. Per maggiori informazioni si consulti il documento d'orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (2). La prova ha inizio con la collocazione delle uova fecondate nelle vasche di prova e dura fino a quando i pesci di controllo raggiungono lo stadio giovanile; la durata dipende dalla specie in esame. Si valutano gli effetti letali e subletali e li si confronta con i valori del controllo, allo scopo di determinare la concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) e, in seguito, i) la concentrazione senza effetti osservati (NOEC) e/o ii) l'EC_x (ad esempio, EC₁₀, EC₂₀), utilizzando un modello di regressione per stimare la concentrazione che produce una variazione di x % dell'effetto misurato. Le concentrazioni con effetto e i parametri da riportare nella relazione possono dipendere dal quadro normativo applicabile. Le concentrazioni di prova devono includere l'EC_x, affinché essa sia ricavata per interpolazione anziché per estrapolazione (si vedano le definizioni nell'appendice 1).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

4. Con "sostanza chimica in esame" s'intende ciò che è sottoposto a prova: occorre conoscerne l'idrosolubilità (cfr. capitolo A.6 del presente allegato) e la pressione di vapore (cfr. capitolo A.4 del presente allegato), e disporre di un metodo d'analisi affidabile per la sua determinazione quantitativa nelle soluzioni di prova, la cui precisione e il limite di quantificazione siano noti e descritti in letteratura. Pur non essendo necessaria, una prova di tossicità acuta (cfr. i capitoli C.1 o C.49 del presente allegato) eseguita di preferenza sulla stessa specie scelta per la presente prova, può fornire informazioni utili.

5. Se il presente metodo è utilizzato per saggiare una miscela, la composizione di quest'ultima dovrebbe essere per quanto possibile caratterizzata, in particolare, mediante l'identità chimica dei suoi componenti, i quantitativi in cui sono presenti e le loro proprietà in quanto sostanze (come quelle di cui sopra). Prima di utilizzare il metodo di prova per saggiare una miscela a fini regolamentari, occorre verificare se genererà risultati accettabili per il fine regolamentare previsto.
6. La formula strutturale, il grado di purezza della sostanza, l'idrosolubilità, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a , il P_{ow} e i risultati di una prova di pronta biodegradabilità (secondo i capitoli C.4 o C.29 del presente allegato, ad esempio) sono informazioni utili.

VALIDITÀ DELLA PROVA

7. Affinché la prova sia valida devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:
 - concentrazione dell'ossigeno disciolto superiore al 60 % del valore di saturazione in aria per tutta la durata della prova;
 - differenza della temperatura dell'acqua tra le diverse vasche di prova o tra giorni consecutivi non superiore a $\pm 1,5$ °C in qualsiasi momento della prova, e mantenimento della temperatura dell'acqua nell'intervallo di temperatura indicato per la specie utilizzata (appendice 2);
 - misurazione analitica delle concentrazioni di prova;
 - tasso complessivo di sopravvivenza delle uova fecondate e dopo la schiusa nel controllo e, se del caso, nel controllo del solvente, uguale o superiore ai valori limite definiti nell'appendice 2.
8. Se si osserva una lieve deviazione dai criteri di validità, se ne analizzano le conseguenze per l'attendibilità dei dati della prova e si riporta tale analisi nella relazione. Gli effetti sulla sopravvivenza, sulla schiusa e sulla crescita osservati nel controllo del solvente, rispetto al controllo negativo, sono discussi nell'ottica dell'affidabilità dei dati della prova e riportati nella relazione.

DESCRIZIONE DEL METODO

Vasche di prova

9. Le vasche di prova possono essere di vetro, acciaio inossidabile o altro materiale chimicamente inerte. Data la forte capacità che il silicone notoriamente possiede di assorbire le sostanze lipofile, l'uso di tubi in silicone negli studi a flusso continuo e di sigillanti in silicone a contatto con l'acqua deve essere ridotto al minimo scegliendo, ad esempio, acquari in vetro monoblocco. Le dimensioni delle vasche devono essere tali da consentire una corretta crescita del gruppo di controllo, mantenere la concentrazione dell'ossigeno disciolto (ad esempio, con le specie ittiche di piccola taglia ciò è possibile con vasche da 7 litri) e rispettare i criteri del tasso di carico di cui al paragrafo 19. Si consiglia di collocare le vasche in modo casuale nella zona in cui è condotta la prova, di preferenza secondo uno schema non completamente casuale ma casuale per blocchi, nel quale tutte le concentrazioni siano rappresentate in ciascun blocco. Le vasche di prova devono essere protette da disturbi indesiderati. È preferibile che, prima dell'introduzione degli organismi, il sistema di prova sia esposto alle concentrazioni previste della sostanza chimica in esame per un tempo sufficiente a dimostrare la stabilità delle concentrazioni.

Scelta delle specie

10. Le specie ittiche raccomandate figurano nella tabella 1. Possono essere impiegate altre specie, ma il protocollo potrebbe dover essere adattato per creare condizioni sperimentali idonee. In tal caso occorre giustificare la scelta della specie e descrivere il metodo sperimentale.

Pesci riproduttori

11. Per il mantenimento dei pesci riproduttori in condizioni soddisfacenti, si rimanda all'appendice 3 e ai riferimenti bibliografici (3) (4) (5).

Manipolazione delle uova fecondate, degli embrioni e delle larve

12. Inizialmente, le uova fecondate, gli embrioni e le larve possono essere esposti in vasche più piccole di vetro o acciaio inossidabile collocate all'interno del recipiente principale e i cui lati o estremità siano costituiti di una rete che permetta alla soluzione di prova di scorrere. Un modo di creare un flusso non turbolento attraverso queste vasche più piccole consiste nel sospenderle a un braccio che le muova verticalmente mantenendo però sempre sommersi gli organismi. Le uova fecondate di Salmonidi possono essere poste su supporti o reti con aperture sufficientemente grandi da poter essere attraversate dalle larve dopo la schiusa.
13. Dopo la schiusa si rimuovono i recipienti, le griglie o le reti eventualmente utilizzati per isolare le uova all'interno della vasca principale di prova, seguendo le indicazioni di cui all'appendice 3, mantenendo però le reti necessarie a evitare che le larve escano. Se occorre trasferire le larve, si avrà cura di non esporle all'aria e di non utilizzare retini per estrarle dai recipienti contenenti le uova. Il momento del trasferimento dipende dalla specie e va indicato nella relazione. Questo trasferimento, tuttavia, non è sempre necessario.

Acqua

14. Si può utilizzare qualsiasi tipo di acqua nella quale la specie studiata presenti tassi adeguati di sopravvivenza a lungo termine e di crescita (cfr. appendice 4). La qualità dell'acqua deve essere costante durante l'intera prova. Per escludere l'eventualità che l'acqua di diluizione influisca indebitamente sui risultati della prova (ad esempio, per complessazione della sostanza chimica in esame) o abbia effetti negativi sui pesci riproduttori si prelevano periodicamente dei campioni per analizzarli. Si determina il tenore di metalli pesanti (ad esempio, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (ad esempio, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻, SO₄²⁻), dell'ammoniaca, dei pesticidi clorurati residui totali, del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione; se è noto che la qualità dell'acqua di diluizione si mantiene relativamente costante, queste misurazioni si possono effettuare, ad esempio, due volte all'anno. Se è noto che la qualità dell'acqua è variabile, le misurazioni sono effettuate con maggiore frequenza, in funzione del grado di variabilità. Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono indicate nell'appendice 4.

Soluzioni di prova

15. Nelle prove a flusso continuo, per immettere nelle vasche la serie di concentrazioni prescelta, occorre un sistema che eroga e diluisce ininterrottamente una soluzione madre della sostanza chimica in esame (ad esempio, una pompa dosatrice, un diluatore proporzionale, un sistema di saturazione). Il flusso della soluzione madre e quello dell'acqua di diluizione devono essere controllati regolarmente e non devono variare di oltre il 10 % durante l'intera prova. Si considera adeguato un flusso equivalente ad almeno cinque volte il volume della vasca di prova su 24 ore (3). Tuttavia, se il tasso di carico di cui al paragrafo 19 è rispettato, si ammette un flusso minore, ad esempio doppio o triplo rispetto al volume della vasca di prova, per impedire l'evacuazione troppo rapida del cibo.
16. Si preparano le soluzioni di prova per diluizione di una soluzione madre fino alle concentrazioni scelte. La soluzione madre è preparata di preferenza per semplice miscela o agitazione della sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione, con l'ausilio di mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne di saturazione (colonne di solubilità) o metodi di dosaggio passivo (6). Non si raccomanda l'uso di un solvente, ma se fosse necessario, si allestisce in parallelo un controllo con la stessa concentrazione di solvente utilizzata nelle vasche di esposizione alla sostanza chimica in esame; è preferibile che il livello di solvente sia lo stesso in tutte le vasche di esposizione e nelle vasche di controllo del solvente. Nei sistemi di diluizione in cui ciò è tecnicamente difficile, la concentrazione di solvente nelle vasche di controllo del solvente deve essere pari alla concentrazione di solvente più alta nelle vasche di esposizione. Per le sostanze difficili da saggiare, si consulti il documento d'orientamento dell'OCSE n. 23 sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (2). La scelta del solvente eventualmente utilizzato dipende dalle proprietà chimiche della sostanza. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 23 raccomanda di non superare una concentrazione di 100µl/l. Per evitare che il solvente possa influire sugli endpoint misurati (7) si raccomanda che la concentrazione di solvente sia la più bassa possibile.
17. Nelle prove semistatiche si possono seguire due diverse procedure di rinnovo del mezzo: o si preparano nuove soluzioni di prova in vasche pulite e si trasferiscono delicatamente le uova e le larve sopravvissute nelle nuove vasche, o si mantengono gli organismi sperimentali nelle vasche di prova e si rinnova una parte (almeno due terzi) della soluzione di prova / di controllo.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione*Durata*

18. La prova inizia il più rapidamente possibile dopo la fecondazione delle uova, di preferenza immergendole nelle soluzioni di prova prima che inizi la segmentazione della discoblastula, o il prima possibile dopo questo stadio. La durata della prova dipende dalla specie utilizzata. Alcune indicazioni in proposito sono riportate nell'appendice 2.

Carico

19. Il numero di uova fecondate all'inizio della prova deve essere sufficiente a soddisfare i criteri statistici. Le uova sono distribuite in modo casuale nei diversi gruppi esposti; il numero minimo di uova per livello di concentrazione è 80, suddivise in parti uguali tra almeno quattro repliche. Il tasso di carico (biomassa per volume di soluzione di prova) deve essere sufficientemente basso da mantenere la concentrazione dell'ossigeno disciolto ad almeno il 60 % del valore di saturazione nell'aria, senza necessità di aerazione, durante lo stadio embrionale e quello larvale. Per le prove a flusso continuo si raccomanda un tasso di carico non superiore a 0,5 g/l (peso umido) su 24 ore e comunque mai superiore a 5 g/l di soluzione (3).

Illuminazione e temperatura

20. Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua devono essere adatti alla specie utilizzata (cfr. appendice 2).

Alimentazione

21. Il regime alimentare è un aspetto determinante ed è quindi indispensabile fornire il cibo adatto a ogni stadio di sviluppo, a partire dal momento giusto e in quantità sufficiente ad assicurare una crescita normale. L'alimentazione deve essere pressoché uguale in tutte le repliche, salvo modifiche per tener conto della mortalità. Per evitare l'accumulo di rifiuti il cibo non consumato e gli escrementi sono eliminati, quando necessario. Alcuni esempi di regime alimentare sono illustrati nell'appendice 3, ma si punta a perfezionare continuamente il regime alimentare sulla base dell'esperienza acquisita in modo da innalzare il tasso di sopravvivenza e ottimizzare la crescita. Il cibo vivo arricchisce l'ambiente e pertanto deve sostituire o integrare il cibo disidratato o congelato, purché sia adatto alla specie e allo stadio di sviluppo.

Concentrazioni di prova

22. Si utilizzano normalmente cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame, intervallate secondo un fattore costante non superiore a 3,2, con almeno quattro repliche per concentrazione. Per determinare la serie delle concentrazioni da saggiare si tiene conto dei dati eventualmente disponibili provenienti da prove di tossicità acuta, di preferenza sulla stessa specie, e/o si effettua un saggio preliminare (1). Tuttavia, nella scelta della serie delle concentrazioni di prova occorre tenere conto di tutte le fonti di informazioni, in particolare i dati del read-across, i dati ricavati da prove di tossicità acuta su embrioni di pesci ecc. Se s'intendono stabilire solo valori NOEC empirici è accettabile, come prova definitiva, una prova limite, o una prova limite estesa, con meno di cinque concentrazioni. L'uso di un numero di concentrazioni inferiore a cinque va giustificato. Non è necessario saggiare concentrazioni della sostanza chimica in esame superiori all' LC_{50} dopo 96 ore, o a 10 mg/l se l' LC_{50} è superiore a questa concentrazione.

Controlli

23. Oltre alla serie di concentrazioni della sostanza chimica in esame, si deve allestire una prova di controllo dell'acqua di diluizione e, se necessario, una prova di controllo del solvente utilizzato (cfr. paragrafo 16).

Frequenza delle misurazioni e delle determinazioni analitiche

24. Prima di avviare l'esposizione si verifica il buon funzionamento del sistema di erogazione della sostanza chimica in esame in tutte le repliche (ad esempio, misurando le concentrazioni di prova). I metodi analitici necessari devono essere chiaramente definiti, tra cui un limite di quantificazione (LOQ) adeguato e una conoscenza sufficiente della stabilità della sostanza nel sistema sperimentale. Durante la prova si determinano le concentrazioni della sostanza chimica in esame a intervalli regolari per caratterizzare l'esposizione. Si eseguono almeno cinque determinazioni. Se si utilizza un sistema a flusso continuo si effettua, almeno una volta alla settimana, la misurazione analitica della sostanza chimica in esame in una replica per ciascuna concentrazione, scegliendo ogni volta repliche diverse. La qualità dei risultati spesso migliora quando si effettuano determinazioni analitiche supplementari. Affinché le determinazioni della sostanza chimica siano eseguite in soluzione vera, può essere necessario filtrare i campioni per eliminare eventuali particelle (con filtri di porosità pari a 0,45 µm, ad esempio), o centrifugarli. Per ridurre l'adsorbimento della sostanza chimica di prova, i filtri devono essere saturati prima dell'uso. Se le concentrazioni misurate non rientrano nell'intervallo 80-120 % della concentrazione nominale, le concentrazioni con effetto devono essere determinate ed espresse come segue; nelle prove a flusso continuo, in rapporto alla media aritmetica delle concentrazioni (per il calcolo della media aritmetica cfr. appendice 6 del metodo di prova C.20 (8)); nelle prove semistatiche, in rapporto alla media geometrica delle concentrazioni misurate (cfr. capitolo 5 del documento di orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (2)).
25. Durante la prova si misurano, almeno una volta alla settimana, l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura in tutte le vasche di prova; se necessario si misurano la salinità e la durezza dell'acqua all'inizio e alla fine della prova. Di preferenza, si controlla costantemente la temperatura almeno in una vasca di prova.

Osservazioni

26. **Stadio embrionale:** verificare il più accuratamente possibile lo stadio embrionale all'inizio dell'esposizione alla sostanza chimica in esame. A tal fine si può utilizzare un campione rappresentativo di uova adeguatamente conservate e pulite.
27. **Schiusa e sopravvivenza:** l'osservazione della schiusa e della sopravvivenza si esegue almeno una volta al giorno e se ne registrano i numeri. Si contano e si scartano le uova che all'inizio della fase di sviluppo embrionale (il primo o il secondo giorno di prova, ad esempio) presentano muffe. Gli embrioni, le larve e gli individui giovani morti vanno rimossi non appena individuati in quanto possono decomporsi rapidamente ed essere fatti a pezzi dagli altri pesci. Nel rimuovere gli individui morti occorre fare estrema attenzione a non danneggiare le uova/larve adiacenti. I segni di decesso dipendono dalla specie e dallo stadio di vita. Ad esempio:
- uova fecondate: soprattutto nei primi stadi, netta perdita di traslucidità e cambiamento della colorazione dovute a coagulazione e/o precipitazione di proteine, con conseguente aspetto bianco opaco;
 - embrioni, larve e pesci giovani: immobilità e/o assenza di movimenti opercolari e/o assenza di battito cardiaco e/o assenza di reazione agli stimoli meccanici.
28. **Aspetto anomalo:** con una frequenza congrua alla durata della prova e alla natura dell'anomalia, si registra il numero di larve o pesci giovani che presentano anomalie morfologiche. La presenza di larve e pesci giovani anomali è un fenomeno naturale che, per alcune specie, può essere dell'ordine di svariati punti percentuali nel/i controllo/i. Se le malformazioni e i comportamenti anomali associati sono considerati gravi al punto da causare grandi e irreversibili sofferenze, l'organismo colpito può essere ritirato dalla prova. Gli animali in queste condizioni sono soppressi in modo incruento e considerati casi di mortalità nella successiva analisi dei dati. Uno sviluppo embrionale normale per la maggior parte delle specie raccomandate nel presente metodo di prova è descritto in letteratura (9) (10) (11) (12).
29. **Comportamento anomalo:** con una frequenza congrua alla durata della prova (ad esempio, una volta al giorno per le specie tropicali) si registrano le anomalie osservate, quali iperventilazione, nuoto scoordinato, immobilità o comportamento alimentare atipici. L'eventuale osservazione di tali effetti, per quanto difficili da quantificare, può facilitare l'interpretazione dei dati sulla mortalità.

30. **Peso:** alla fine della prova si pesano i pesci sopravvissuti, almeno per replica (registrando il numero di pesci presenti nella replica e il peso medio per pesce); è preferibile utilizzare il peso umido (previa asciugatura su carta assorbente), ma si può anche indicare nella relazione il peso secco (13).
31. **Lunghezza:** alla fine della prova si misura ogni pesce. Si raccomanda di misurarne la lunghezza totale, ma in caso di marcescenza della pinna caudale o erosione delle pinne è possibile utilizzare la lunghezza standard. Si applica lo stesso metodo per tutti i pesci utilizzati nella prova. I pesci possono essere misurati, ad esempio, con un calibro, una macchina fotografica digitale, o un micrometro oculare graduato. Le lunghezze minime tipiche sono indicate nell'appendice 2.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

32. Se si deve determinare la NOEC, si raccomanda che il disegno sperimentale e la prova statistica prescelta abbiano una potenza tale (almeno 80 %) da consentire di individuare i cambiamenti d'importanza biologica negli endpoint. Le pertinenti concentrazioni con effetto e i parametri da riportare nella relazione possono dipendere dal quadro normativo. Se si deve determinare un'EC_x, il disegno sperimentale e il modello di regressione prescelto devono permettere di stimare questa concentrazione in modo che i) l'intervallo di confidenza del 95 % per l'EC_x non contenga il valore zero e non sia troppo ampio, ii) l'intervallo di confidenza del 95 % per la media prevista alla concentrazione EC_x non contenga la media del controllo, e iii) il modello di regressione non presenti una mancanza di adattamento (*lack-of-fit*) significativa ai dati. In entrambi i casi occorre precisare la variazione percentuale di ogni endpoint che s'intende rilevare o stimare. Il disegno sperimentale dovrebbe essere concepito in modo da permettere ciò. Quando le predette condizioni per determinare l'EC_x non sono soddisfatte, si utilizza l'approccio basato sulla NOEC. Poiché è improbabile che la stessa variazione percentuale si verifichi in tutti gli endpoint, così come che si possa concepire un'esperienza fattibile che soddisfi i suddetti criteri per tutti gli endpoint, è necessario che il disegno sperimentale sia concepito in modo da concentrarsi sugli endpoint che sono importanti per l'esperienza. Le appendici 5 e 6 contengono diagrammi di analisi statistica e orientamenti per entrambi gli approcci per guidare il trattamento dei dati e la scelta della prova o del modello statistico più adatti. È possibile impiegare altri approcci statistici, purché siano scientificamente giustificati.
33. È necessario analizzare le variazioni all'interno di ogni serie di repliche effettuando un'analisi della varianza o avvalendosi di tabelle di contingenza e utilizzare metodi adeguati di analisi statistica fondati su questa analisi. Per effettuare un confronto multiplo fra i risultati ottenuti per ogni concentrazione e quelli ottenuti per il controllo, si raccomandano i test di Jonckheere-Terpstra o di Williams, nel caso delle risposte continue, e il test regressivo di Cochran-Armitage, nel caso delle risposte quantali compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona e senza indizi di varianza extrabinomiale (14). In caso vi siano indizi di varianza extrabinomiale, si raccomandano il test di Cochran-Armitage (15) (16) modificato da Rao-Scott, i test di Williams o Dunnett (dopo trasformazione arcoseno della radice quadrata), o di Jonckheere-Terpstra, applicati alle proporzioni relative a ogni replica. Se i dati non sono compatibili con una relazione monotona concentrazione-risposta può essere utile ricorrere ai test di Dunnett, di Dunn o di Mann-Whitney, in caso di risposte continue, e al test esatto di Fisher in caso di risposte quantali (14) (17) (18). Quando si applica un metodo o un modello statistico occorre assicurarsi che i requisiti del metodo o del modello siano soddisfatti (ad esempio, la variabilità da una vasca all'altra è stimata e presa in considerazione nel disegno sperimentale o nel modello o test statistico utilizzato) Si valuta il grado di normalità dei dati; l'appendice 5 indica il trattamento da riservare ai residui di un'ANOVA. L'appendice 6 contiene ulteriori considerazioni sulla regressione. Occorre vagliare l'opportunità di trasformazioni per soddisfare i requisiti del test statistico. Le trasformazioni intese ad adattare un modello di regressione richiedono tuttavia, grande prudenza, dal momento che, ad esempio, una variazione del 25 % della risposta non trasformata non corrisponde a una variazione del 25 % della risposta trasformata. In tutte le analisi è la vasca di prova, e non il pesce, che costituisce l'unità di analisi e l'unità sperimentale, elemento che deve trovare riscontro sia nei test di ipotesi sia nella regressione (3) (14) (19) (20).

Relazione sulla prova

34. I dati descritti in appresso devono figurare nella relazione di prova.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostrituente:

- aspetto fisico, idrosolubilità e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- identificazione chimica, come denominazione IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurità, se opportuno e fattibile, ecc. (compreso il tenore di carbonio organico, se del caso).

Sostanza multicostrituente, sostanze UVCB e miscele:

- caratterizzazione, per quanto possibile, mediante, ad esempio, l'identità chimica dei costituenti (vedi sopra), loro presenza quantitativa e loro proprietà fisico-chimiche pertinenti.

Specie sperimentali:

- nome scientifico, ceppo, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

Condizioni sperimentali:

- procedura sperimentale utilizzata (statica, semistatica o a flusso continuo);
- fotoperiodo/i;
- disegno sperimentale (ad esempio, numero di vasche di prova e repliche, numero di uova per replica, materiale e dimensioni della vasca di prova — altezza, larghezza, volume -, volume d'acqua per vasca di prova;
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare l'agente solubilizzante, se usato, e la sua concentrazione);
- metodo di dosaggio della sostanza chimica in esame (ad esempio pompe dosatrici, sistemi di diluizione);
- efficienza di recupero del metodo e concentrazioni nominali di prova, limite di quantificazione, medie dei valori misurati, rispettive deviazioni standard nelle vasche di prova, metodo con cui tali deviazioni e medie sono state ottenute così come dati comprovanti che le misurazioni corrispondono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;
- caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione dell'ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale (idem), solidi in sospensione (idem), salinità del mezzo di prova (idem) e altre eventuali misurazioni eseguite;
- qualità dell'acqua nelle vasche di prova, pH, durezza, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto;
- informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

Risultati riportati individualmente (o per replica), sotto forma di media e di coefficiente di variazione, se del caso, per i seguenti endpoint:

- prova che il controllo soddisfa i criteri di accettabilità stabiliti per la sopravvivenza globale della specie in esame (appendice 2);
- dati sulla mortalità in ciascuno stadio (embrionale, larvale e giovanile) e mortalità cumulativa;
- giorni trascorsi fino alla schiusa, numero giornaliero di uova schiuse e fine della schiusa;
- numero di pesci sani alla fine della prova.
- dati relativi alla lunghezza (specificare se lunghezza standard o totale) e al peso degli animali sopravvissuti;
- incidenza, descrizione e numero delle eventuali anomalie morfologiche;
- incidenza, descrizione e numero delle eventuali anomalie comportamentali;

- approccio seguito per l'analisi statistica (analisi di regressione o analisi della varianza) e per il trattamento dei dati (test o modello statistico utilizzato);
- concentrazione senza effetti osservati (NOEC) per ogni risposta studiata;
- concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) (a $p = 0,05$) per ogni risposta studiata;
- EC_x per ogni risposta studiata, se del caso, e intervalli di confidenza (90 % o 95 %, per esempio), grafico del modello adattato utilizzato per calcolarla, pendenza della curva concentrazione-risposta, formula del modello di regressione, stima dei parametri del modello e dei rispettivi errori tipo.

Deviazioni rispetto al metodo di prova.

Discussione dei risultati, compresa qualsiasi influenza delle deviazioni dal metodo di prova sui risultati della prova.

Tabella 1

Specie di pesci raccomandate per la prova

DI ACQUA DOLCE	ESTUARINE e MARINE
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trota iridea	<i>Cyprinodon variegatus</i>
<i>Pimephales promelas</i>	Menidia sp. Latterino
<i>Danio rerio</i> Danio zebrato	
<i>Oryzias latipes</i> Pesce del riso o Medaka	

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.
- (3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.
- (4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, *et al.* (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. *et al.* (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.
- (8) Capitolo C.20 del presente allegato, Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.

- (9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
 - (10) Kimmel, H. B. *et al.* (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253–310.
 - (11) Gonzalez-Doncel, M. *et al.* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthyidae) *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1–14.
 - (12) Devlin, E.W. *et al.* (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..
 - (13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, 370 – 376.
 - (14) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
 - (15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.
 - (16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.
 - (17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
 - (18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
 - (19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
 - (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

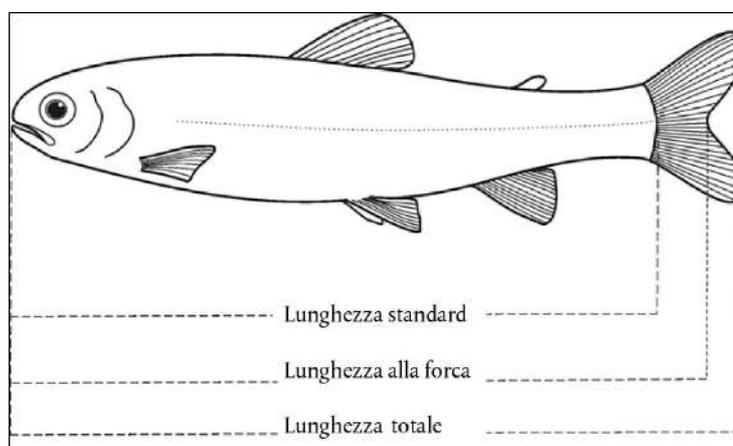
Lunghezza alla forca (FL): lunghezza dall'apice del muso e all'estremità dei raggi centrali della pinna caudale; è utilizzata per i pesci in cui è difficile determinare la fine della colonna vertebrale (www.fishbase.org).

Lunghezza standard (SL): lunghezza del pesce misurata tra l'apice del muso e l'estremità posteriore dell'ultima vertebra o l'estremità posteriore della parte laterale media della piastra ipurale. In altre parole, questa misurazione non tiene conto della lunghezza della pinna caudale. (www.fishbase.org).

Lunghezza totale (TL): lunghezza dall'apice del muso all'estremità del lobo più lungo della pinna caudale, generalmente misurata con i lobi appiattiti nel prolungamento della linea mediana. La misurazione si effettua in linea retta, senza seguire la curva del corpo (www.fishbase.org).

Figura 1

Descrizione delle varie lunghezze utilizzate



Sostanza chimica: sostanza o miscela.

EC_x: (concentrazione con effetto nel x %): la concentrazione che provoca un effetto nel x % degli organismi di prova durante un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC₅₀ è la concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta durante il periodo di esposizione definito.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC — Lowest Observed Effect Concentration): concentrazione più bassa saggiata della sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC devono tuttavia avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Se queste due condizioni non sono soddisfatte occorre spiegare come è stata scelta la LOEC (e la NOEC). Le appendici 5 e 6 forniscono orientamenti al riguardo.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC, alla quale non vengono osservati effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo durante il periodo di esposizione definito.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry — Unione internazionale di chimica pura e applicata.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (notazione semplificata lineare delle molecole).

CONDIZIONI SPERIMENTALI, DURATA E CRITERI DI SOPRAVVIVENZA PER LE SPECIE RACCOMANDATE

SPECIE	CONDIZIONI SPERIMENTALI			DURATA RACCOMANDATA DELLA PROVA	Valore medio minimo tipico della lunghezza totale dei controlli alla fine dello studio (mm) ⁽¹⁾	SOPRAVVIVENZA DEI CONTROLLI (minima)	
	Temperatura (°C)	Salinità (‰) ⁽⁶⁾	Fotoperiodo (ore)			Alla schiusa	Dopo la schiusa
Di acqua dolce							
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trota iridea	10 ± 1,5 ⁽²⁾		12 — 16 ⁽³⁾	2 settimane dopo che i pesci del controllo iniziano ad assumere cibo (o 60 giorni a decorrere dalla schiusa)	40	75 %	75 %
<i>Pimephales promelas</i>	25 ± 1,5		16	32 giorni a decorrere dall'inizio della prova (o 28 giorni dalla schiusa)	18	70 %	75 %
<i>Danio rerio</i> Danio zebra	26 ± 1,5		12 — 16 ⁽⁴⁾	30 giorni a decorrere dalla schiusa	11	70 %	75 %
<i>Oryzias latipes</i> Pesce del riso o Medaka	25 ± 2		12 — 16 ⁽⁴⁾	30 giorni a decorrere dalla schiusa	17	80 %	80 %
Estuarine e marine							
<i>Cyprinodon variegatus</i>	25 ± 1,5	15-35 ⁽⁵⁾	12 — 16 ⁽⁴⁾	32 giorni a decorrere dall'inizio della prova (o 28 giorni dalla schiusa)	17	75 %	80 %
<i>Menidia sp.</i> Latterino	22 — 25	15-35 ⁽⁵⁾	13	28 giorni	20	80 %	60 %

Legenda:

- (1) Il valore medio minimo tipico della lunghezza totale non è un criterio di validità ma le medie inferiori al valore indicato devono essere esaminate attentamente per valutare la sensibilità della prova. I valori medi minimi della lunghezza totale sono determinati sulla base di una selezione dei dati disponibili.
- (2) Il particolare ceppo di trota iridea studiato può richiedere l'uso di altre temperature. I pesci riproduttori devono essere mantenuti alla stessa temperatura delle uova. Le uova che provengono da un fornitore commerciale richiedono un breve periodo d'adattamento (1-2 ore) alla temperatura alla quale si svolgerà la prova.
- (3) Durante la settimana successiva alla schiusa le larve sono tenute al buio, tranne quando sono esaminate; per tutto il resto della prova si mantiene un'illuminazione fioca (fotoperiodo compreso tra 12 e 16 ore)⁽⁴⁾.
- (4) Indipendentemente dalle condizioni sperimentali, l'illuminazione prescelta deve essere costante.
- (5) La deviazione ammessa in tutte le prove è di ± 2%/^{60°}.

ORIENTAMENTI PER L'ALIMENTAZIONE E LA MANIPOLAZIONE DEI PESCI RIPRODUTTORI E DEI PESCI UTILIZZATI NELLE PROVE, DELLE SPECIE RACCOMANDATE

SPECIE	CIBO (*)				MOMENTO DEL TRASFERRIMENTO DOPO LA SCHIUSA	MOMENTO DELLA PRIMA SOMMINISTRAZIONE DI CIBO
	Pesci riproduttori	Larve appena schiuse	Pesci giovani			
			Tipo	Frequenza		
Di acqua dolce						
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trota iridea	Mangime per trote	Nessuno ⁽⁴⁾	Mangime di svezamento per trote NA	2-4 volte al giorno	14-16 giorni dopo la schiusa o all'affioramento (facoltativo)	19 giorni dopo la schiusa o all'affioramento
<i>Pimephales promelas</i>	NA, fiocchi, AC	NA	NA48, fiocchi	2-3 volte al giorno	A partire dal 90 % di schiusa	2 giorni dopo la schiusa
<i>Danio rerio</i> Danio zebrato	NA, fiocchi	Mangime per larve disponibile in commercio, protozoi ⁽⁶⁾ , protetine ⁽⁹⁾	NA48, fiocchi	NA una volta al giorno; fiocchi due volte al giorno	A partire dal 90 % di schiusa	2 giorni dopo la schiusa
<i>Oryzias latipes</i> Pesce del riso o Medaka	Fiocchi	NA, fiocchi (oppure protozoi o rotiferi)	NA48, fiocchi (o rotiferi)	NA una volta al giorno; fiocchi due volte al giorno o fiocchi e rotiferi una volta al giorno	Non pertinente	6-7 giorni dopo la deposizione delle uova
Estuarine e marine						
<i>Cyprinodon variegatus</i>	NA, fiocchi AC	NA	NA48	2-3 volte al giorno	Non pertinente	1 giorno dopo la schiusa/affioramento
<i>Menidia sp.</i> Latterino	NA48, fiocchi	NA	NA48	2-3 volte al giorno	non pertinente	1 giorno dopo la schiusa/affioramento

Legenda

(*) Cibo fornito ad libitum. Per evitare l'accumulo di rifiuti il cibo non consumato e gli escrementi sono eliminati, quando necessario.

AC = artemie congelate; adulti di *Artemia* sp

NA = naupli di artemia; appena schiusi

NA48 = naupli di artemia; di 48 ore di età

⁽⁴⁾ le larve provviste di sacco vitellino non hanno bisogno di essere alimentate

⁽⁶⁾ filtrati da coltura mista

⁽⁹⁾ granuli da processo di fermentazione

Appendice 4

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

Componente	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 ng/l
Somma dei pesticidi organoclorurati e dei difenili polichlorurati, totali	50 ng/l
Cloro organico totale	25 ng/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Argento	100 ng/l

Appendice 5

ORIENTAMENTI PER L'ANALISI STATISTICA CON CUI DETERMINARE LA NOEC

Orientamenti generali

Ogni replica costituisce un'unità di analisi. Pertanto, nel caso delle misurazioni continue, come le dimensioni, si calcola la media o la mediana di ogni replica e i valori ottenuti costituiscono i dati da analizzare. Occorre dimostrare la potenza dei test utilizzati, di preferenza facendo riferimento a una base adeguata di dati storici del laboratorio. Per ogni endpoint si indica il test statistico da utilizzare e la variazione (minima) delle dimensioni dei pesci rilevabile con una potenza statistica del 75-80 %.

Le basi di dati disponibili al momento dell'elaborazione del presente metodo di prova definiscono la potenza ottenibile con i metodi statistici raccomandati. Il laboratorio deve dimostrarsi in grado di soddisfare il requisito della potenza effettuando un'analisi della potenza o dimostrando che il coefficiente di variazione (CV) di ogni risposta non supera il 90° percentile dei coefficienti di variazione utilizzati per elaborare il metodo di prova, indicati nella tabella 1. Se si dispone unicamente delle medie e delle mediane delle repliche, il coefficiente di variazione intra repliche può essere ignorato.

Tabella 1

90° percentile dei coefficienti di variazione per le specie d'acqua dolce selezionate

Specie	Risposta	CV_inter repliche	CV_intra repliche
Trota iridea	Lunghezza	17,4	9,8
	Peso	10,1	28
Pimephales promelas	Lunghezza	16,9	13,5
	Peso	11,7	38,7
Danio zebrato	Lunghezza	43,7	11,7
	Peso	11,9	32,8

Per quasi tutti i test statistici utilizzati per valutare gli studi tossicologici condotti in laboratorio, i confronti di interesse riguardano i gruppi esposti rispetto al controllo. Non è, pertanto, giustificato esigere un test F ANOVA statisticamente significativo prima di utilizzare il test di Dunnett o il test di Williams, né un test statisticamente significativo di Kruskal-Wallis prima di realizzare il test di Jonckheere-Terpstra, di Mann-Whitney, o di Dunn (Hochberg e Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Il test di Dunnett consente confronti multipli e l'uso di un test F come filtro ne pregiudica i tassi di falsi positivi e falsi negativi. Analogamente, i test regressivi di Williams e di Jonckheere-Terpstra con un livello di significatività di 0,05 in ogni fase mantengono un tasso complessivo di falsi positivi del 5 % e questo tasso, così come la potenza dei test, sono pregiudicati dall'utilizzo del test F o del test di Kruskal-Wallis come filtro. Il test di Mann-Whitney e il test di Dunn devono essere corretti ai fini dei confronti multipli, e si consiglia la correzione di Bonferroni-Holm.

In OCSE (2006) si trova un'ampia bibliografia e un'analisi approfondita della maggior parte delle raccomandazioni sui test di ipotesi e sulla verifica dei presupposti sottostanti.

Trattamento dei controlli quando si utilizza un solvente

Se si utilizza un solvente è necessario prevedere un controllo dell'acqua di diluizione e un controllo del solvente. Si confronta la risposta ottenuta per il primo con la risposta ottenuta per il secondo e, se non presentano differenze statisticamente significative, i due controlli vengono combinati nell'analisi statistica. In caso contrario, si utilizza il controllo del solvente per determinare la NOEC o per stimare l'EC_x, ma non il controllo dell'acqua di diluizione. Si veda la restrizione enunciata nei criteri di validità (paragrafo 7).

Per quanto riguarda la lunghezza, il peso, la proporzione di uova schiuse, larve morte o larve anomale e il primo o l'ultimo giorno della schiusa o dell'affioramento, si utilizza un test T o un test di Mann-Whitney per confrontare il controllo dell'acqua di diluizione e il controllo del solvente al livello di significatività dello 0,05, ignorando tutti i gruppi esposti. I risultati di questi test devono figurare nella relazione.

Misurazioni morfologiche (lunghezza e peso)

La lunghezza e il peso dei pesci possono seguire una distribuzione normale o log normale. In entrambi i casi i valori medi per replica tendono a una distribuzione normale, come previsto dal teorema del limite centrale e corroborato dai risultati di oltre un centinaio di studi condotti nei primi stadi di vita di tre specie di acqua dolce. In alternativa, se i dati o le basi di dati storici indicano una distribuzione log normale dei valori relativi alle dimensioni dei pesci, si può calcolare il logaritmo della media dei valori corrispondenti ai pesci che formano ogni replica e i dati da analizzare saranno gli antilogaritmi di tali logaritmi di medie per replica.

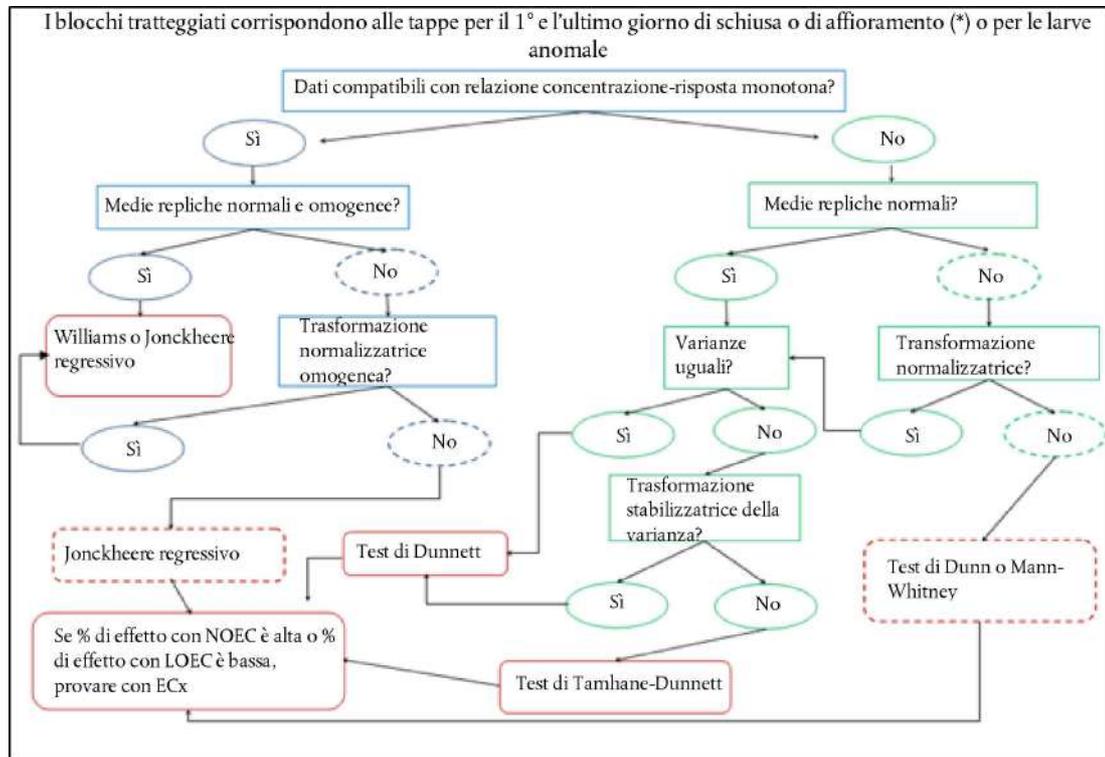
Si valuta la compatibilità dei dati con una distribuzione normale e con una varianza omogenea. A tal fine, si utilizzano i residui di un modello ANOVA in cui la concentrazione sia l'unica variabile esplicativa. Si può ricorrere a rappresentazioni sotto forma di grafico a dispersione, istogrammi e grafici a ramo e foglia; oppure si può utilizzare un test formale, come il test di Shapiro-Wilk o il test di Anderson-Darling. La compatibilità con una varianza omogenea può essere valutata tramite un esame visivo dello stesso grafico a dispersione o, formalmente, per mezzo del test di Levene. La verifica della normalità e dell'omogeneità della varianza è necessaria solo per i test parametrici (per esempio, Williams o Dunnett).

Occorre prestare attenzione a eventuali valori anomali e alle conseguenti implicazioni sull'analisi. È possibile ricorrere al test dei valori anomali di Tukey e all'esame visivo dei summenzionati grafici dei residui. Si rammenta che l'osservazione corrisponde alla replica intera, pertanto l'esclusione di valori anomali dall'analisi necessita attenta ponderazione.

I test statistici che si basano sulle caratteristiche del disegno sperimentale e sulle aspettative biologiche sono test di tendenza regressivi, come il test di Williams e il test di Jonckheere-Terpstra. Questi test presuppongono una relazione concentrazione-risposta monotona, per cui occorre valutare la compatibilità dei dati con tale presupposto; la valutazione può essere effettuata visivamente osservando il grafico a dispersione delle medie per replica in funzione della concentrazione di prova. Sarà utile sovrapporre al grafico a dispersione un grafico lineare a tratti che colleghi le concentrazioni medie ponderate per la dimensione del campione della replica; un diagramma lineare che si discosta molto da un tracciato monotono può indicare la necessità di applicare test non parametrici. In alternativa si possono utilizzare test formali. Un test formale semplice consiste nel calcolare i contrasti lineari e quadratici delle medie della concentrazione: se il contrasto quadratico è significativo e il contrasto lineare non lo è, può esserci un problema di monotonia, da rivalutare sulla base dei suddetti grafici; se la normalità e l'omogeneità della varianza pongono dubbi, i suddetti contrasti possono essere costruiti a partire dalla trasformazione dei dati in ranghi. Si può ricorrere a metodi alternativi, come il test di monotonia di Bartholomew, che però aggiungono complessità.

Figura 2

Diagramma per la determinazione della NOEC in base alle misurazioni morfologiche (lunghezza e peso)



(*) Queste risposte non soddisfano mai i presupposti di modelli o analisi parametrici

A meno che i dati non siano compatibili con i requisiti di questi test, si determina la NOEC per applicazione regressiva del test di Williams o del test di Jonckheere-Terpstra. In OCSE (2006) si trovano informazioni dettagliate sull'applicazione di questi metodi. Se i dati non sono compatibili con i requisiti di un test di tendenza regressivo, si può utilizzare il test di Dunnett o il test di Tamhane-Dunnett (T3), entrambi i quali permettono confronti multipli. Questi test presuppongono una distribuzione normale e, nel caso del test di Dunnett, omogeneità della varianza. Se queste condizioni non sono soddisfatte, si può ricorrere al test non parametrico di Dunn. OCSE (2006) fornisce maggiori informazioni su tutti questi test. La figura 2 illustra schematicamente come scegliere il test adatto.

Schiusa delle uova e sopravvivenza delle larve

I dati da analizzare sono la proporzione di uova che si schiudono o di larve che sopravvivono in ogni replica. Si valutano tali proporzioni in termini di varianza extrabinomiale, che è frequente ma non universale in questi due casi. Il diagramma nella figura 3 serve a orientare la scelta del test adatto, a corredo del testo esplicativo.

Due tipi di test sono normalmente utilizzati: il test C (α) di Tarone (Tarone, 1979), e i test Chi-quadrato, ciascuno applicato separatamente ad ogni concentrazione di prova. Se si osserva una varianza extrabinomiale, anche solo in una concentrazione di prova, occorre utilizzare metodi che la contemplino.

Formula 1

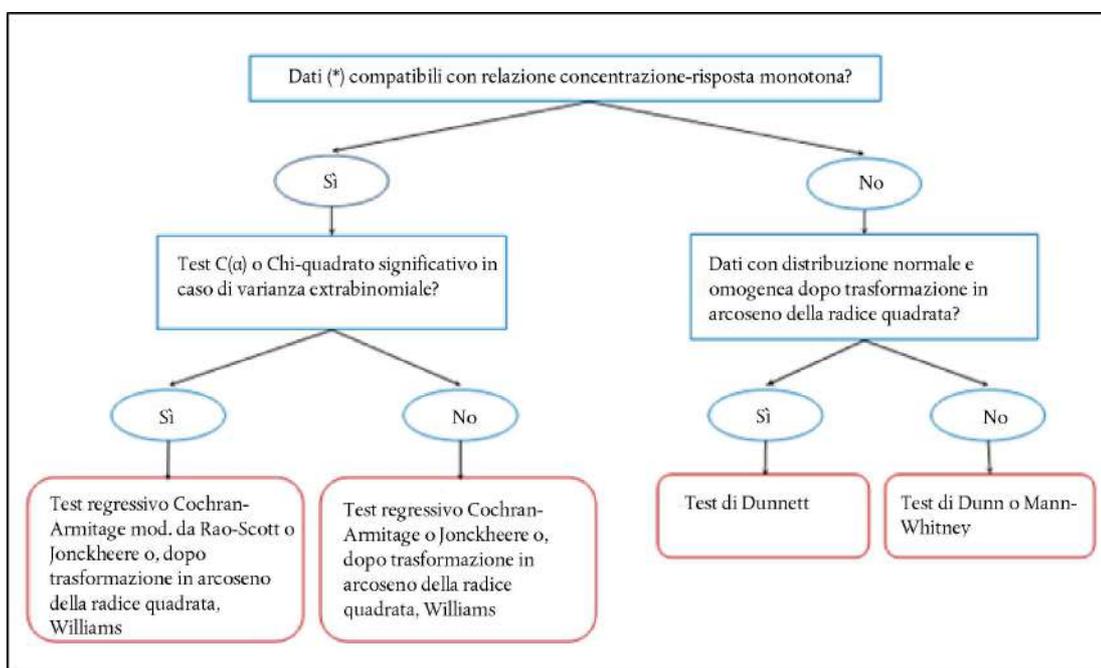
test C(α) di Tarone (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

dove \hat{p} è la proporzione media per una data concentrazione, m è il numero delle repliche (vasche), n_j è il numero degli individui presenti nella replica j , e x_j è il numero degli individui che rispondono in detta replica, ossia i casi di non schiusa o di decesso. Questo test si applica separatamente a ciascuna concentrazione. Può essere considerato un test Chi-quadrato corretto, ma nelle simulazioni di bassa potenza si è dimostrato più potente di un Chi-quadrato.

Figura 3

Diagramma per determinare la NOEC in base alla schiusa delle uova e dalla mortalità delle larve



(*) I dati da analizzare sono le proporzioni per replica.

Se non vi sono indizi significativi di varianza extrabinomiale, si può utilizzare il test regressivo di Cochran-Armitage; poiché questo test ignora le repliche, si raccomanda che, nel caso vi siano indizi significativi di varianza extrabinomiale, si applichi la correzione di Rao-Scott (RSCA), che tiene conto delle repliche, delle loro dimensioni e della varianza extrabinomiale. Altre possibilità sono i test regressivi di Williams e di Jonckheere-Terpstra, così come il test di Dunnett, illustrati nella sezione relativa alle misurazioni morfologiche. Questi test possono essere applicati indipendentemente dall'esistenza di varianza extrabinomiale, ma la loro potenza è minore (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao e Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Primo o ultimo giorno di schiusa o affioramento

La risposta da analizzare è un numero intero, che corrisponde al giorno della prova in cui l'osservazione indicata è effettuata in una determinata replica. L'intervallo di valori è generalmente molto limitato e sono frequenti proporzioni elevate di valori collegati, ad esempio, il primo giorno di schiusa è identico in tutte le repliche del controllo e, eventualmente, per la concentrazione più bassa o per le due concentrazioni più basse. I test parametrici, come quelli di Williams e Dunnett, non sono adatti all'analisi di tali dati. A meno che non vi siano indizi di netta non monotonia, il test regressivo di Jonckheere-Terpstra è molto potente nel rilevare gli effetti delle sostanze chimiche. In caso contrario si può utilizzare il test di Dunn.

Larve con anomalie

La risposta da analizzare è il numero di larve nelle quali è stata rilevata un'anomalia di qualsiasi genere. Questa risposta ha spesso un'incidenza bassa e presenta gli stessi problemi del primo giorno di schiusa, così come, talvolta, una relazione concentrazione-risposta talvolta erratica. Se dai dati si evince una funzione approssimativamente monotona della concentrazione, il test regressivo di Jonckheere-Terpstra è potente nel rilevamento degli effetti; in caso contrario si può utilizzare il test di Dunn.

BIBLIOGRAFIA

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, *Technometrics* 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y., D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, *Biometrika* 64, 9-14.

Appendice 6

ORIENTAMENTI PER L'ANALISI STATISTICA DELLE STIME PER REGRESSIONE

Orientamenti generali

Le osservazioni alle quali adattare il modello sono le medie (della lunghezza e del peso) per replica o le proporzioni (della schiusa delle uova e della mortalità larvale) per replica (OCSE 2006).

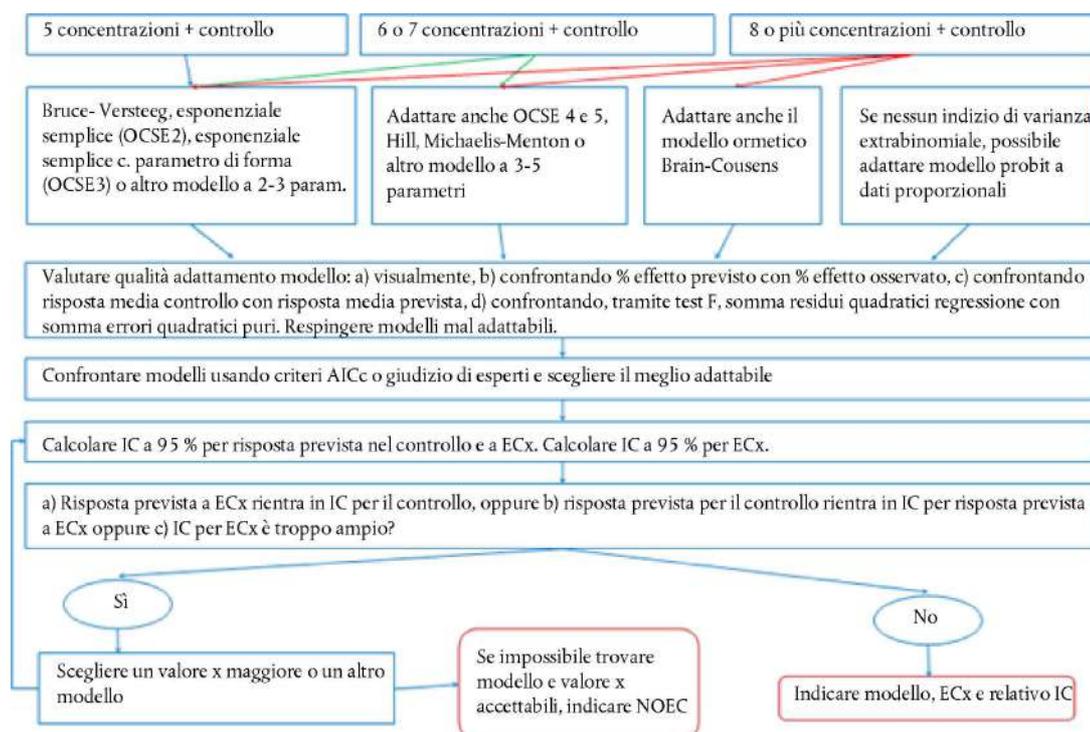
Si raccomanda, in generale, una regressione ponderata, utilizzando come fattore di ponderazione le dimensioni del campione della replica. Sono possibili altri metodi di ponderazione, ad esempio utilizzando come fattore di ponderazione la risposta media prevista o una combinazione di questa e delle dimensioni del campione della replica. Non si raccomanda la ponderazione per l'inverso della varianza dei campioni a ciascuna concentrazione (Bunke *et al.* 1999, Seber e Wild, 2003, Motulsky e Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Qualsiasi trasformazione delle risposte prima dell'analisi deve mantenere l'indipendenza delle osservazioni; inoltre l'EC_x e i limiti del relativo intervallo di confidenza devono essere espressi nelle unità di misura originali e non in unità trasformate. Per esempio, una variazione del 20 % del logaritmo della lunghezza non equivale a una variazione del 20 % della lunghezza (Lyles *et al.* 2008, Draper e Smith 1999).

Il diagramma della figura 4 schematizza il procedimento per la stima dell'EC_x, a corredo della spiegazione dettagliata fornita nel testo.

Figura 4

Diagramma per la stima dell'EC_x in funzione delle medie della lunghezza, del peso o della proporzione di schiusa delle uova o mortalità larvale per replica (per i dettagli si veda il testo)



Considerazioni sulla schiusa delle uova e sulla mortalità larvale

Per la schiusa delle uova e la mortalità larvale è in genere preferibile adattare un modello decrescente, a meno che non si intenda adattare un modello probit nel seguente modo: si adatta il modello alla proporzione di uova non schiuse o di larve morte; la ragione per cui si procede così è che l' EC_{50} si riferisce alla concentrazione alla quale si verifica una variazione dell' x % rispetto alla risposta media del controllo. Se il 5 % delle uova del controllo non si schiudono e il modello traduce la mancata schiusa, l' EC_{20} corrisponderà alla concentrazione alla quale si verifica una variazione del 20 % della proporzione del 5 % di uova non schiuse nel controllo, ossia una variazione pari a $0,2 \times 0,05 = 0,01$; si tratta di un aumento di 1 punto percentuale, che innalza al 6 % la proporzione di uova non schiuse. Una variazione così piccola non può essere stimata in modo significativo sulla base dei dati disponibili e non ha rilevanza biologica. Se invece il modello traduce la proporzione di uova schiuse, la proporzione corrispondente al controllo sarà, in questo esempio, del 95 % e una riduzione del 20 % rispetto alla media del controllo equivarrà a una variazione di $0,95 \times 0,2 = 0,18$, ossia una variazione della riuscita della schiusa dal 95 % al 77 % (= 95-18); la concentrazione che produce questo effetto può così essere stimata e presumibilmente è di maggiore interesse. Il problema non si pone con le misurazioni morfologiche, sebbene gli effetti negativi in tal caso corrispondano in genere a una diminuzione di peso o lunghezza.

Modelli applicabili alla morfologia (lunghezza o peso) e alla riuscita della schiusa o alla sopravvivenza larvale.

Ad eccezione del modello ormetico Brain-Cousens, tutti i seguenti modelli sono descritti e raccomandati in OCSE (2006). I modelli OCSE da 2 a 5 sono discussi per esperienze di ecotossicità anche in Slob (2002). Esistono, naturalmente, molti altri modelli che potrebbero essere utili: Bunke, *et al.* (1999) ne enumera una serie che non sono qui citati e abbondano i riferimenti ad altri. I modelli elencati di seguito, ampiamente utilizzati, sono considerati particolarmente adatti per esperienze di ecotossicità.

Con 5 concentrazioni della sostanza di prova più un controllo

- Modello di Bruce-Versteeg
- Modello esponenziale semplice (OCSE 2)
- Modello esponenziale con parametro di forma (OCSE 3)
- Modello esponenziale semplice con limite inferiore (OCSE 4)

Con 6 o più concentrazioni della sostanza di prova più un controllo

- Modello esponenziale con parametro di forma e limite inferiore (OCSE 5)
- Modello di Michaelis-Menten
- Modello di Hill

In presenza di ormesi comprovata visivamente (improbabile in caso di schiusa delle uova o di sopravvivenza larvale, ma talvolta registrata nelle osservazioni morfologiche)

- Modello ormetico Brain-Cousens; Brain e Cousens (1989).

Modelli alternativi per la mancata schiusa delle uova e la mortalità larvale

- In assenza di indizi di varianza extrabinomiale è possibile adattare a queste risposte modelli crescenti probit (o logistici), stimando l'incidenza nel controllo nell'adattamento del modello. Non è però questo il metodo da privilegiare, perché considera unità di analisi non la replica, ma l'individuo (Morgan 1992, O'Hara Hines e Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Qualità dell'adattamento di un modello

- Confrontare visivamente la diminuzione percentuale, osservata e prevista, corrispondente a ogni concentrazione di prova (Motulsky e Christopoulos 2004, Draper e Smith 1999).

- Confrontare, mediante un test F, l'errore quadratico medio di regressione con l'errore quadratico medio puro (Draper e Smith 1999).
- Verificare che ogni termine del modello sia significativamente diverso da zero (vale a dire, determinare l'importanza di tutti i termini del modello) (Motulsky e Christopoulos 2004).
- Rappresentare graficamente i residui della regressione in funzione della concentrazione di prova, ricorrendo eventualmente a una scala logaritmica della concentrazione. Questo grafico non deve definire alcun andamento; i punti sono distribuiti in modo casuale secondo una linea orizzontale all'altezza zero.
- Valutare la normalità della distribuzione e l'omogeneità della varianza dei dati, come indicato nell'appendice 5.
- Inoltre, valutare la normalità della distribuzione dei residui del modello di regressione, utilizzando gli stessi metodi indicati nell'appendice 5 per i residui di un modello ANOVA.

Confronto dei modelli

- Utilizzare i criteri AICc di Akaike. Valori AICc più piccoli traducono un migliore adattamento; se $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$, il modello A è quasi sicuramente migliore del modello B (Motulsky e Christopoulos, 2004).
- Confrontare i due modelli visivamente per vedere in che misura rispondono ai criteri sopraindicati per un modello.
- Si raccomanda di applicare il principio di parsimonia, secondo il quale occorre utilizzare il modello più semplice che si adatti ragionevolmente bene ai dati (Ratkowsky 1993, Lyles et al. 2008).

Qualità della stima dell' EC_x

L'intervallo di confidenza (IC) dell' EC_x non deve essere troppo ampio. Occorre vagliare statisticamente l'ampiezza massima che può avere l'intervallo di confidenza affinché l' EC_x sia utile. Dalle simulazioni dell'adattamento dei modelli di regressione ai dati della schiusa delle uova e ai dati morfologici emerge che l'ampiezza di circa il 75 % degli intervalli di confidenza dell' EC_x ($x = 10, 20$ o 30) non include più di due concentrazioni di prova. Questo dato fornisce un orientamento generale di quanto è accettabile e realizzabile. Molti autori sostengono che è necessario riportare nella relazione gli intervalli di confidenza di tutti i parametri del modello e che parametri con intervalli ampi sono indice d'inaccettabilità del modello (Ott e Longnecker 2008, Alvord e Rossio 1993, Motulsky e Christopoulos 2004, Lyles et al. 2008, Seber and Wild 2003, Bunke et al. 1999, Environment Canada 2005).

L'intervallo di confidenza corrispondente all' EC_x (o a qualsiasi altro parametro del modello) non deve includere il valore zero (Motulsky and Christopoulos 2004). Si tratta dell'equivalente, nella regressione, della differenza minima con significatività spesso citata negli approcci sperimentali basati sulla verifica delle ipotesi (ad esempio, Wang et al. 2000). Corrisponde anche al fatto che l'intervallo di confidenza delle risposte medie alla LOEC non contiene la media del controllo. È importante riflettere sulla plausibilità scientifica delle stime dei parametri, ad esempio, se l'intervallo di confidenza corrispondente a y_0 è ± 20 % non sarà plausibile alcuna stima dell' EC_{10} . Se il modello prevede un effetto del 20 % alla concentrazione C e l'effetto massimo osservato a questa concentrazione e a concentrazioni inferiori è 10 %, l' EC_{20} non è plausibile (Motulsky e Christopoulos 2004, Wang et al. 2000, Environment Canada 2005).

L' EC_x non è estrapolabile al di fuori dell'intervallo delle concentrazioni positive (Draper and Smith 1999; OCSE, 2006). Ad esempio, un orientamento generale potrebbe essere che l' EC_x non sia inferiore di oltre il 25 % circa alla concentrazione più bassa saggiata, né superiore nella stessa misura a quella più alta.

BIBLIOGRAFIA

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); *Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time*, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application*. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, *Journal of Industrial Microbiology* 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, *Nonlinear Regression*, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.
