

C.48 Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 229 (2012). La necessità di sviluppare e validare un saggio sui pesci per individuare le sostanze che agiscono a livello endocrino deriva dai timori che i livelli di sostanze chimiche presenti nell'ambiente possano indurre effetti nocivi sull'uomo e sulla fauna selvatica a causa dell'interazione con il sistema endocrino. Nel 1998 l'OCSE ha avviato un'attività ad elevata priorità allo scopo di revisionare le linee guida esistenti ed elaborarne di nuove per lo screening e la valutazione di potenziali interferenti endocrini. Uno degli elementi di tale attività è stata l'elaborazione di una linea guida per l'individuazione delle sostanze chimiche attive sul sistema endocrino di specie ittiche. Il saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci è stato sottoposto ad un completo programma di validazione comprendente studi inter-laboratorio con sostanze chimiche selezionate, allo scopo di dimostrare la rilevanza e l'affidabilità della prova per l'individuazione delle sostanze chimiche che agiscono sulla riproduzione dei pesci attraverso vari meccanismi, tra cui quelli endocrini (1, 2, 3, 4, 5). Tutti gli endpoint della linea guida dell'OCSE sono stati validati sui ciprinidi della specie *Pimephales promelas* (fathead minnow) e un sottoinsieme degli endpoint (la vitellogenina e i caratteri sessuali secondari) è stato validato sul medaka giapponese (*Oryzias latipes*) e sul danio zebrato (*Danio rerio*) (la vitellogenina). I lavori di validazione sono stati sottoposti a revisione da parte di un comitato di esperti designati dai Coordinatori Nazionali del Programma delle Linee Guida dell'OCSE (6) e in parte da un comitato indipendente di esperti commissionato dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (29). Il saggio non mira a individuare specifici meccanismi di disfunzione ormonale giacché gli animali sperimentali possiedono un asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (asse HPG) sano, in grado di reagire alle sostanze che hanno effetti sull'asse HPG a vari livelli.
2. Il presente metodo di prova descrive un saggio di screening in vivo in cui pesci, maschi sessualmente maturi e femmine riproduttrici, sono esposti insieme a una sostanza chimica in esame, per un tempo limitato del loro ciclo biologico (21 giorni). Al termine del periodo di esposizione di 21 giorni, sono misurati uno o due biomarcatori dell'attività endocrina della sostanza chimica in esame, sia nei maschi che nelle femmine; questi biomarcatori sono la vitellogenina e i caratteri sessuali secondari. La vitellogenina viene misurata nelle specie *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* e *Danio rerio*, mentre i caratteri sessuali secondari sono valutati nella specie *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes*. Inoltre, la fecondità quantitativa viene monitorata quotidianamente per tutta la durata della prova. Le gonadi sono preservate e un esame istopatologico può essere effettuato per valutare la capacità riproduttiva degli animali sperimentali e aumentare il peso dell'evidenza di altri endpoint.
3. Il presente saggio è una prova in vivo per lo screening riproduttivo e la sua applicazione deve essere considerata nel contesto del "Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino" (30). In tale quadro concettuale il saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci è proposto al livello 3 come prova in vivo che fornisce dati riguardo alle vie e ai meccanismi endocrini selezionati.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. La vitellogenina (VTG) è generalmente prodotta dal fegato delle femmine di vertebrati ovipari in risposta agli estrogeni endogeni. Si tratta di un precursore delle proteine del tuorlo che, una volta prodotto nel fegato, è trasportato, attraverso il flusso sanguigno, agli ovociti in crescita, in cui è incorporato e modificato. La vitellogenina è difficilmente rilevabile nel plasma dei pesci maschi e di femmine immature, a causa dello scarso livello di estrogeni in circolo; tuttavia, il fegato è in grado di sintetizzare e secernere la vitellogenina in risposta ad una stimolazione estrogenica esogena.
5. La misurazione della vitellogenina serve ad individuare sostanze chimiche con differenti meccanismi di azione estrogenica. Come documentato in numerose pubblicazioni scientifiche oggetto di valutazione inter pares (ad es. (7)), l'individuazione di sostanze chimiche estrogeniche può essere effettuata misurando l'induzione di vitellogenina nei pesci maschi. L'induzione di vitellogenina è stata anche dimostrata dopo esposizione a androgeni aromatizzabili (8, 9). Una riduzione del livello di estrogeni circolanti nelle femmine, ottenuta, ad esempio, mediante inibizione dell'aromatasi — il complesso enzimatico che converte l'androgeno endogeno in estrogeno naturale 17 β -estradiolo — induce una diminuzione del livello di VTG che viene utilizzata proprio per individuare le sostanze capaci di inibire l'aromatasi (10, 11). La rilevanza biologica della risposta della vitellogenina in seguito all'inibizione degli estrogeni o dell'aromatasi è consolidata ed è stata ampiamente documentata. Tuttavia la produzione di VTG nelle femmine può anche essere influenzata da meccanismi di tossicità generale e da meccanismi d'azione non-endocrini (epatotossicità, ad esempio).

6. Vari metodi di misurazione sono stati sviluppati con successo e armonizzati per i saggi di routine. Questo è il caso dei metodi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) che sono specie-specifici e utilizzano tecniche di immunochimica per quantificare la VTG utilizzando piccoli campioni di fegato o di sangue prelevati su pesci (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Ai fini della misurazione della VTG possono essere prelevati campioni dalle specie *Pimephales promelas* (sangue), *Danio rerio* (sangue o omogenati testa/coda) e *Oryzias latipes* (fegato). In quest'ultima specie è stata rilevata una buona correlazione fra la concentrazione ematica ed epatica di VTG (19). Le procedure raccomandate per la raccolta dei campioni ai fini dell'analisi della VTG sono descritte nell'appendice 6. Kit per la misurazione della VTG sono comunemente reperibili; si raccomanda che tali kit si basino su un metodo ELISA validato e specifico per la specie in esame.
7. I caratteri sessuali secondari dei pesci maschi di determinate specie sono visibili a occhio nudo, sono quantificabili e rispondono ai livelli degli androgeni endogeni. Ciò vale per le specie *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes* ma non per il danio zebrato, che non possiede caratteri sessuali secondari quantificabili. Le femmine mantengono la capacità di sviluppare caratteri sessuali secondari maschili quando sono esposte a sostanze androgeniche presenti nell'acqua. Diversi studi scientifici documentano questo tipo di risposta in *Pimephales promelas* (20) e *Oryzias latipes* (21). La diminuzione, nei maschi, dei caratteri sessuali secondari deve essere interpretata con cautela a causa della limitata significatività statistica dei relativi studi. Tale interpretazione, inoltre, dovrebbe basarsi sul giudizio esperto e sulla determinazione del "peso dell'evidenza". L'utilizzo del danio zebrato per questa prova incontra dei limiti a motivo dell'assenza di caratteri sessuali secondari quantificabili capaci di rispondere alle sostanze che agiscono sugli androgeni.
8. Nel *Pimephales promelas* il principale indicatore di esposizione ad androgeni esogeni è il numero dei tubercoli nuziali situati sul muso del pesce femmina. Nella femmina di *Oryzias latipes* il numero dei processi papillari costituisce il principale marcatore dell'esposizione ad androgeni esogeni. Le procedure raccomandate per valutare i caratteri sessuali secondari in *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes* sono contenute, rispettivamente, nelle appendici 5A e 5B.
9. Il saggio sui pesci, della durata di 21 giorni, comprende la valutazione della produzione quantitativa di uova e la preservazione delle gonadi per l'esame istopatologico facoltativo. Alcune autorità di regolamentazione possono richiedere questo ulteriore endpoint per una valutazione più completa della capacità riproduttiva degli animali sperimentali, o nei casi in cui la vitellogenina e i caratteri sessuali secondari non hanno risposto all'esposizione a sostanze chimiche. Sebbene alcuni endpoint possano essere altamente diagnostici (ad esempio l'induzione di VTG nei maschi e la formazione di tubercoli nelle femmine), nel saggio non tutti gli endpoint (ad esempio, la fecondità e l'istopatologia delle gonadi) sono destinati a individuare in modo inequivocabile specifici meccanismi di azione cellulari. La serie di endpoint, considerata nel complesso, consente piuttosto di trarre conclusioni riguardo ad eventuali disordini endocrini, fornendo quindi orientamenti per ulteriori prove. Anche se non specificamente legata al sistema endocrino, la fecondità, a causa della sua dimostrata sensibilità a sostanze che agiscono a livello endocrino (5), è un importante endpoint da includere, in quanto se essa e altri endpoint non sono influenzati da un determinato composto si può ritenere con ragionevole sicurezza che tale composto non agisca a livello endocrino. Se tuttavia la fecondità ne risente, essa contribuirà notevolmente a dare peso all'evidenza delle conclusioni. Indicazioni per l'interpretazione dei dati e l'accettazione dei risultati della prova sono fornite più avanti nel presente metodo di prova.
10. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. Pesci maschi e femmine della medesima specie in stato riproduttivo sono esposti alle sostanze chimiche in esame all'interno della stessa vasca. Il loro stato di adulti riproduttori permette una chiara differenziazione tra i sessi e quindi un'analisi di ciascun biomarcatore in funzione del sesso e permette di registrarne la rispettiva sensibilità alle sostanze esogene. Al termine della prova, il sesso è confermato mediante esame macroscopico delle gonadi dopo l'apertura ventrale con forbici. Una tabella riassuntiva delle pertinenti condizioni sperimentali figura nell'appendice 2. Per questa prova si selezionano generalmente esemplari di pesci

in condizione di riprodursi, mentre vanno scartati gli esemplari senescenti. La sezione relativa alla "selezione dei pesci" fornisce orientamenti sull'età dei pesci e sul loro stato di riproduttori. La prova è condotta mediante l'esposizione degli animali sperimentali a tre livelli di concentrazione della sostanza chimica in esame ed un controllo con acqua, oltre ad un eventuale controllo con solvente, se necessario. Per il danio zebrato sono utilizzate due vasche o repliche per trattamento (ciascuna vasca contiene 5 maschi e 5 femmine). Per *Pimephales promelas* sono utilizzate quattro vasche o repliche per trattamento (ciascuna vasca contiene 2 maschi e 4 femmine). Ciò permette di tener conto del comportamento territoriale del *Pimephales promelas* maschio preservando la potenza statistica della prova a un livello sufficiente. Per *Oryzias latipes* sono utilizzate quattro vasche o repliche per trattamento (ciascuna vasca contiene 3 maschi e 3 femmine). Il periodo di esposizione è di 21 giorni ed il campionamento dei pesci è effettuato al 21° giorno di esposizione. La fecondità quantitativa è monitorata quotidianamente.

12. All'atto del campionamento effettuato il 21° giorno, tutti gli animali sono soppressi in modo incruento. I caratteri sessuali secondari sono misurati in *Pimephales promelas* e in *Oryzias latipes* (v. appendice 5A e Appendice 5B); campioni di sangue sono prelevati per misurare la VTG nel danio zebrato e nel ciprinide; in alternativa può essere utilizzato anche un omogenato testa/coda per la determinazione della VTG nel danio zebrato (appendice 6), mentre a tal fine nel medaka sono effettuati prelievi epatici (appendice 6); le gonadi sono fissate intere o dissezionate per un possibile esame istopatologico (22).

CRITERI DI ACCETTAZIONE DELLA PROVA

13. Affinché i risultati della prova siano accettabili devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

- la mortalità nei controlli con acqua (o solvente) non eccede 10 per cento al termine del periodo di esposizione;
- la concentrazione dell'ossigeno disciolto è rimasta almeno al 60 per cento del valore di saturazione in aria per tutto il periodo di esposizione;
- la temperatura dell'acqua non differisce mai di oltre $\pm 1,5$ °C fra le diverse vasche nel periodo di esposizione ed è mantenuta entro un intervallo di 2 °C all'interno del range di temperatura specificato per la specie utilizzata (appendice 2);
- i dati disponibili dimostrano che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi;
- si può dimostrare che i pesci si riproducono attivamente in tutte le repliche prima di iniziare l'esposizione alla sostanza chimica e nelle repliche di controllo durante la prova.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

14. Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

- a. misuratori dell'ossigeno e del pH;
- b. attrezzatura per la determinazione della durezza e dell'alcalinità dell'acqua;
- c. apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura e preferibilmente per il monitoraggio continuo;
- d. vasche in materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata in relazione al carico e alla densità di popolazione raccomandati (cfr. appendice 2);
- e. substrato di riproduzione per la specie *Pimephales promelas* e il danio zebrato; l'appendice 4 fornisce le necessarie indicazioni dettagliate;
- f. bilancia sufficientemente precisa (precisione di $\pm 0,5$ mg).

Acqua

15. Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui la specie sperimentale dimostri di sopravvivere a lungo termine e di crescere in modo adeguato. La qualità dell'acqua deve essere costante per tutta la durata della prova. Il pH deve essere compreso tra 6,5 e 8,5, ma nel corso della medesima prova deve essere compreso entro un intervallo di $\pm 0,5$ unità di pH. Per verificare che l'acqua di diluizione non alteri il risultato della prova (ad esempio per complessazione della sostanza chimica in esame), si prelevano e analizzano campioni a vari intervalli. La misurazione dei metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), dei principali anioni e cationi (ad esempio Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , e SO_4^{2-}), dei pesticidi (ad esempio pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione va effettuata ad esempio ogni tre mesi, se l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Se la qualità dell'acqua si è dimostrata costante per almeno un anno, le titolazioni possono essere effettuate con minore frequenza (ad esempio ogni sei mesi). Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'appendice 3.

Soluzioni di prova

16. Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno preparate per diluizione di una soluzione madre. La soluzione madre deve essere di preferenza preparata semplicemente miscelando o agitando la sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (cioè agitazione o ultrasuoni). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne di saturazione (colonne di solubilità). L'uso di un mezzo disperdente con solvente non è raccomandato, ma può rivelarsi necessario. In tal caso, è necessario testare in parallelo una vasca di controllo contenente la stessa concentrazione di solvente delle vasche contenenti la sostanza chimica in esame. Per sostanze chimiche difficili da testare, un solvente può essere la migliore soluzione tecnica; a tal fine si dovrebbe consultare il documento d'orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele "difficili" (23). La scelta del solvente è determinata dalle proprietà chimiche della sostanza o della miscela. Il documento di orientamento dell'OCSE raccomanda di non superare una concentrazione massima di 100 $\mu\text{l/l}$. Tuttavia un recente studio (24) ha dimostrato che l'uso di solventi durante le prove sulle sostanze attive sul sistema endocrino può generare preoccupazioni di altro tipo. Se è necessario usare un solvente, si raccomanda pertanto di ridurre la concentrazione al minimo tecnicamente possibile (che dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame).
17. Nella prova va utilizzato un sistema a flusso continuo che eroga e diluisce in modo continuato la soluzione madre della sostanza chimica in esame (ad esempio, pompa dosatrice, diluitor proporzionale, sistema di saturazione) per fornire le concentrazioni di prova nelle vasche sperimentali. La portata della soluzione madre e dell'acqua di diluizione dovrebbe essere controllata periodicamente, preferibilmente ogni giorno, e non dovrebbe variare di oltre il 10 % per tutta la durata della prova. Occorre evitare l'utilizzo di tubi in plastica di cattiva qualità o altri materiali che possano contenere sostanze biologicamente attive. Ai fini della selezione del materiale per il sistema a flusso continuo va preso in considerazione l'adsorbimento della sostanza chimica in esame rispetto a tale materiale.

Mantenimento dei pesci

18. I pesci vanno selezionati da una popolazione allevata in laboratorio, preferibilmente dallo stesso ceppo, che sia stata acclimatata per almeno due settimane prima della sperimentazione in condizioni di qualità dell'acqua e di illuminazione simili a quelle usate durante la prova. È importante che il tasso di carico e la densità della popolazione (cfr. definizioni nell'appendice 1) siano adeguati per la specie utilizzata ai fini della prova (cfr. appendice 2).
19. Dopo un periodo di ambientazione di 48 ore, si registra la mortalità e si applicano i seguenti criteri:
- mortalità superiore al 10 % della popolazione in sette giorni: l'intero lotto viene respinto;
 - mortalità fra il 5 % e il 10 % della popolazione: acclimatazione per altri sette giorni; se nel corso della seconda settimana la mortalità supera il 5 %, respingere l'intero lotto;
 - mortalità inferiore al 5 % della popolazione in sette giorni: accettare il lotto.
20. I pesci non devono essere sottoposti a trattamenti per patologie durante i periodi di acclimatazione, pre-esposizione ed esposizione.

Pre-esposizione e selezione dei pesci

21. Si raccomanda un periodo di pre-esposizione di una-due settimane, durante il quale i pesci rimangono in vasche simili a quelle della prova. I pesci vanno nutriti ad libitum durante tutto il periodo di acclimatazione e di esposizione. La fase di esposizione ha inizio con l'utilizzo di adulti sessualmente dimorfici provenienti da una popolazione allevata in laboratorio di animali sessualmente maturi (aventi, ad esempio nel caso dei ciprinidi e dei medaka, caratteri sessuali secondari visibili a occhio nudo), che si riproducono attivamente. A titolo di orientamento generale (che non può però essere considerato indipendentemente dall'osservazione dello stato riproduttivo dell'intero lotto), i ciprinidi dovrebbero avere un'età di circa 20 (± 2) settimane, a condizione di essere stati allevati a una temperatura di 25 ± 2 °C durante l'intera vita; i medaka dovrebbero avere un'età di circa 16 (± 2) settimane, a condizione di essere stati sempre allevati ad una temperatura di 25 ± 2 °C, mentre gli esemplari di *Danio rerio* dovrebbero avere un'età di circa 16 (± 2) settimane, se allevati ad una temperatura di 26 ± 2 °C. La produzione di uova deve essere valutata quotidianamente durante la fase di pre-esposizione. Si raccomanda di includere i pesci nella fase di esposizione della prova quando la riproduzione è stata osservata in tutte le vasche di replica. In questa fase non si possono fornire indicazioni quantitative sulla produzione giornaliera di uova auspicabile, ma è piuttosto comune osservare una produzione media di > 10 uova al giorno per femmina per ciascuna specie. Si deve usare una disposizione a blocchi casuale in funzione della produzione di uova per assegnare le repliche ai vari livelli sperimentali al fine di garantire un'equilibrata distribuzione delle repliche.

DISEGNO SPERIMENTALE

22. Sono utilizzate tre concentrazioni della sostanza chimica in esame e una vasca (contenente acqua) di controllo; se necessario un'altra vasca di controllo con solvente. I dati possono essere analizzati per determinare le differenze statisticamente significative tra le risposte corrispondenti a ciascuna concentrazione e al controllo. Tali analisi non servono a valutare i rischi, quanto a determinare se è necessario sottoporre la sostanza chimica in esame a ulteriore sperimentazione per stabilire potenziali effetti negativi a più lungo termine (sopravvivenza, sviluppo, crescita e riproduzione) (25).
23. Nel caso degli esemplari di *Danio rerio*, il 21° giorno di sperimentazione vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione (5 maschi e 5 femmine in ciascuna delle due repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina. Nel caso dei medaka, il 21° giorno di sperimentazione vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione (3 maschi e 3 femmine in ciascuna delle quattro repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina e della valutazione dei caratteri sessuali secondari. Nel caso dei ciprinidi il 21° giorno di esposizione vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione (2 maschi e 4 femmine in ciascuna delle quattro repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina e della valutazione dei caratteri sessuali secondari. È necessaria una valutazione quantitativa della fecondità e i tessuti gonadici devono essere fissati interamente o dissezionati per un possibile esame istopatologico, se necessario.

Selezione delle concentrazioni sperimentali

24. Ai fini della prova la concentrazione massima è fissata al livello della concentrazione massima tollerata (MTC), ottenuta mediante un rangefinder o altri dati relativi alla tossicità, oppure fissata a 10 mg/l, oppure determinata in funzione della solubilità massima in acqua, a seconda di quale sia il risultato più basso. La MTC è definita come la concentrazione massima della sostanza chimica in esame che comporti una mortalità inferiore al 10 %. L'applicazione di tale approccio presuppone l'esistenza di dati empirici sulla tossicità acuta o altri dati sulla tossicità a fronte dei quali la MTC possa essere stimata. La stima della MTC potrebbe essere inaccurata e richiede generalmente il giudizio professionale di un esperto.
25. Sono necessarie tre concentrazioni di prova, che differiscano di un fattore costante non superiore a 10, e una vasca di controllo con l'acqua di diluizione (più, se necessario, una vasca con solvente). Si raccomanda un intervallo dei fattori di distanza compreso tra 3,2 e 10.

PROCEDURA

Selezione e pesatura dei pesci da sottoporre alla prova

26. È importante ridurre al minimo la differenza di peso tra i pesci all'inizio della prova. L'appendice 2 fornisce gli intervalli adeguati delle dimensioni per le diverse specie raccomandate per questa prova. Se possibile, all'inizio del saggio, l'intervallo di peso di tutti i pesci maschi e femmine del lotto utilizzato deve essere mantenuto entro un margine di ± 20 % intorno alla media aritmetica di ciascun sesso. Si raccomanda di pesare un sottocampione di pesci prima della prova per stimare il peso medio.

Condizioni di esposizione*Durata*

27. La durata del test è di 21 giorni, a seguito di un periodo di pre-esposizione. La durata raccomandata del periodo di pre-esposizione va da una a due settimane.

Alimentazione

28. I pesci sono nutriti ad libitum con cibo adatto (appendice 2) in quantità sufficiente per mantenerli in buona condizione fisica. Occorre evitare la crescita microbica e l'intorbidimento dell'acqua. A titolo indicativo, la razione quotidiana può essere suddivisa in due o tre parti uguali somministrate più volte al giorno, con almeno tre ore d'intervallo. Un'unica razione maggiore è accettabile, in particolare durante il fine settimana. I pesci non vanno nutriti nelle 12 ore che precedono i prelievi/la necroscopia.
29. Il cibo somministrato ai pesci deve essere esaminato per individuare l'eventuale presenza di contaminanti [pesticidi organoclorurati, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB)]. Va evitata una dieta con un'alta concentrazione di fitoestrogeni, perché pregiudicherebbe la reazione della prova a un noto antagonista degli estrogeni (ad esempio 17- β estradiolo).
30. Il cibo avanzato e il materiale fecale vanno rimossi dalle vasche almeno due volte alla settimana, ad esempio pulendo con cura il fondo di ciascuna vasca con un sifone.

Illuminazione e temperatura

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

Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche

32. Prima che inizi il periodo di esposizione, va verificato il buon funzionamento del sistema di distribuzione della sostanza chimica in esame. Vanno acquisiti tutti i metodi analitici necessari, comprese sufficienti conoscenze sulla stabilità della sostanza chimica nel sistema. Durante la prova le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate a intervalli regolari verificando, preferibilmente ogni giorno ma almeno due volte alla settimana, la portata del diluente e della soluzione madre della sostanza tossica. Tale portata non deve variare di oltre il 10 % per tutta la durata della prova. Si raccomanda di misurare le effettive concentrazioni della sostanza chimica in esame in ciascuna vasca all'inizio della prova e successivamente una volta alla settimana.
33. Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata adeguatamente mantenuta nel corso dell'intera prova in un intervallo di ± 20 % della concentrazione nominale, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati.

34. Può essere necessario filtrare (ad esempio utilizzando membrane con pori di 0,45 µm) o centrifugare i campioni; in tal caso la procedura raccomandata è la centrifugazione. Se però è dimostrato che la sostanza chimica in esame non adsorbe sui filtri, è accettabile anche la filtrazione.
35. Durante la prova l'ossigeno disciolto, la temperatura e il pH sono misurati in tutte le vasche almeno una volta alla settimana. La durezza totale e l'alcalinità sono misurate almeno una volta alla settimana nelle vasche di controllo e in una vasca con la massima concentrazione. È auspicabile che la temperatura sia controllata continuamente almeno in una vasca sperimentale.

Osservazioni

36. Alcune risposte generali (ad esempio sopravvivenza) e biologiche (ad esempio livelli di VTG) sono valutate nel corso o al termine della prova. È necessario il monitoraggio quantitativo giornaliero della fecondità. La misurazione e la valutazione di questi parametri e la loro utilità sono descritti più sotto.

Sopravvivenza

37. Occorre esaminare i pesci quotidianamente durante la prova. Eventuali casi di mortalità vanno registrati e i pesci morti rimossi dalla vasca quanto prima possibile. Gli esemplari morti non devono essere sostituiti né nelle vasche di controllo né in quelle di sperimentazione. Il sesso degli esemplari morti durante la prova è determinato mediante osservazione macroscopica delle gonadi.

Comportamento e aspetto

38. Deve essere annotato qualsiasi comportamento anomalo (rispetto ai controlli), che può comprendere segnali indicativi di una tossicità generale, quali iperventilazione, movimenti natatori scoordinati, perdita di equilibrio, inattività o alimentazione atipiche. Occorre inoltre rilevare le eventuali anomalie esterne (quali emorragie, decolorazione). Tali segnali di tossicità vanno valutati con prudenza in sede di interpretazione dei dati poiché potrebbero indicare concentrazioni alle quali i biomarcatori di potenziali effetti sul sistema endocrino non sono affidabili. Le osservazioni sul comportamento possono inoltre fornire informazioni qualitative utili per giustificare potenziali requisiti futuri in materia di sperimentazione sui pesci. Ad esempio è stata osservata un'aggressività territoriale nei maschi normali o nelle femmine mascolinizzate dei ciprinidi a seguito di esposizione ad androgeni. Negli esemplari di *Danio rerio*, il caratteristico comportamento di accoppiamento e riproduzione dopo le prime luci dell'alba è ridotto o ostacolato dall'esposizione agli estrogeni o agli antiandrogeni.
39. Poiché la manipolazione dei pesci potrebbe alterare rapidamente alcune caratteristiche fisiche (segnatamente il colore), occorre procedere ad osservazioni qualitative prima di rimuovere i pesci dal sistema sperimentale. Le esperienze finora effettuate sui ciprinidi indicano che alcune sostanze che agiscono sul sistema endocrino possono inizialmente alterare le seguenti caratteristiche esterne: colore della livrea (chiaro o scuro), motivi ricorrenti nella colorazione (presenza di strisce verticali) e forma del corpo (regione della testa e regione toracica). Le osservazioni relative alle caratteristiche fisiche dei pesci vanno pertanto valutate nel corso e al termine della prova.

Fecondità

40. Osservazioni quantitative giornaliere della riproduzione vanno annotate sulla base delle repliche. La produzione di uova va registrata come il numero di uova per femmina superstite al giorno sulla base delle repliche. Le uova sono rimosse giornalmente dalle vasche sperimentali. Per i ciprinidi e il danio zebrato i substrati di riproduzione vanno posti nella vasca sperimentale per permettere ai pesci di riprodursi in condizioni normali. L'appendice 4 fornisce ulteriori dettagli dei substrati di riproduzione raccomandati per il danio zebrato (appendice 4A) e i ciprinidi (appendice 4B). Non si ritiene necessario fornire un substrato di riproduzione per i medaka.

Soppressione incruenta

41. Il 21° giorno, vale a dire alla fine del periodo di esposizione, i pesci vengono soppressi con idonei quantitativi di tricaina [metan solfonato di tricaina, Metacaina, (MS 222) (CAS 886-86-2)] in soluzione di 100-500 mg/l tamponata con 300 mg/l NaHCO₃ (bicarbonato di sodio, CAS 144-55-8) per ridurre l'irritazione della mucosa; prelievi di sangue o di tessuto sono quindi effettuati per la determinazione della VTG (cfr. sezione sulla vitellogenina).

Osservazione dei caratteri sessuali secondari

42. Determinate sostanze chimiche che agiscono sul sistema endocrino possono indurre alterazioni dei caratteri sessuali secondari specializzati (numero di tubercoli nuziali nei ciprinidi maschi e processi papillari nei medaka maschi). Segnatamente, sostanze che presentano particolari meccanismi di azione possono determinare la comparsa anomala di caratteri sessuali secondari in animali del sesso opposto. Ad esempio, antiandrogeni quali trenbolone, metiltestosterone e diidrotestosterone possono provocare l'insorgere di tubercoli nuziali prominenti nei ciprinidi femmina e di processi papillari nei medaka femmina (11, 20, 21). È stato inoltre segnalato che antagonisti dei recettori degli estrogeni possono ridurre il numero dei tubercoli nuziali e le dimensioni dell'ispessimento situato tra nuca e dorso degli adulti maschi di ciprinidi (26, 27). Tali osservazioni morfologiche grossolane possono fornire informazioni qualitative e quantitative utili per giustificare potenziali requisiti futuri in materia di sperimentazione sui pesci. Il numero e le dimensioni dei tubercoli nuziali nei ciprinidi nonché quelli dei processi papillari nei medaka possono essere quantificati direttamente, o più comodamente, su esemplari non soggetti a test. Le procedure raccomandate per la valutazione dei caratteri sessuali secondari dei ciprinidi e dei medaka figurano rispettivamente nell'appendice 5A e appendice 5B.

Vitellogenina (VTG)

43. Un campione di sangue è prelevato dall'arteria/vena caudale mediante un tubo capillare ematocrito con eparina, o in alternativa mediante puntura cardiaca effettuata con siringa. In funzione della dimensione del pesce, i volumi di sangue prelevati sono generalmente di 5-60 μ l per individuo nei ciprinidi e 5-15 μ l per individuo nel danio zebrato. Il plasma è separato dal sangue mediante centrifugazione prima di essere conservato con inibitori di proteasi a - 80 °C fino all'analisi per la determinazione della VTG. Per contro, nei medaka è utilizzato un prelievo epatico e nel danio zebrato può essere impiegato un omogenato testa/coda come campione tissutale per la determinazione della VTG (appendice 6). La misurazione della VTG è basata su un metodo ELISA omologo convalidato utilizzando anticorpi omologhi e uno standard VTG omologo. Si raccomanda di utilizzare un metodo in grado di individuare concentrazioni di VTG molto basse (fino a pochi ng/ml di plasma o ng/mg di tessuti), corrispondenti al livello generale nei pesci maschi non soggetti ad esposizione.
44. Il controllo della qualità dell'analisi della VTG sarà condotto mediante l'applicazione di standard, prove in bianco e almeno una duplicazione delle analisi. Per ciascun metodo ELISA va effettuato un test sull'effetto della matrice (effetto di diluizione del campione) per determinare il fattore minimo di diluizione del campione. Ciascuna piastra ELISA utilizzata per la determinazione della VTG deve comprendere i seguenti campioni di controllo della qualità: almeno sei standard di calibrazione che coprono l'intervallo di concentrazioni di VTG attese e almeno una prova in bianco di collegamento non specifica (analisi in duplicato). L'assorbanza delle prove in bianco è inferiore al 5 % dell'assorbanza massima degli standard di calibratura. Sono analizzate almeno due aliquote (pozzetti in doppio) di ciascuna diluizione del campione. I pozzetti in doppio che differiscono di oltre il 20 % sono sottoposti a una nuova analisi.
45. Il coefficiente di correlazione (R^2) delle curve di calibrazione deve essere superiore a 0,99. Tuttavia una correlazione elevata non è sufficiente a garantire una previsione adeguata della concentrazione per tutti gli intervalli. Oltre ad ottenere una correlazione sufficientemente elevata per la curva di calibrazione, la concentrazione di ciascuno standard, calcolato a partire dalla curva di calibrazione, deve essere compresa tra 70 e 120 % della concentrazione nominale. Se le concentrazioni nominali tendono ad allontanarsi dalla retta di regressione della calibrazione (a concentrazioni inferiori, ad esempio), può essere necessario dividere la curva di calibrazione in due gruppi di intervalli, uno alto e uno basso, o utilizzare un modello non lineare per adattare i dati relativi all'assorbanza. Se la curva è divisa, i due segmenti di retta devono avere un coefficiente di correlazione $R^2 > 0,99$.
46. Il limite di rilevazione (LOD) è definito come il limite al di sotto del quale la concentrazione è troppo bassa perché la sostanza sia individuata, e il limite di quantificazione (LOQ) è definito come il limite al di sotto del quale la concentrazione è troppo bassa perché la sostanza sia individuata, moltiplicato per il coefficiente di diluizione più basso.
47. Ciascun giorno in cui è effettuata l'analisi della VTG, è analizzato un campione fortificato ottenuto a partire da uno standard di riferimento inter-prova (appendice 7). Il rapporto tra la concentrazione prevista e la concentrazione misurata verrà quindi annotato sistematicamente assieme ai risultati dei singoli test eseguiti nello stesso giorno.

Esame istopatologico delle gonadi

48. L'esame istopatologico delle gonadi può essere richiesto dalle autorità di regolamentazione per esaminare l'organo bersaglio sull'asse HPG a seguito di un'esposizione chimica. A tale fine le gonadi sono fissate intere o dissezionate. Quando è richiesto un esame istopatologico, si cercano risposte specifiche relative agli effetti sul sistema endocrino nelle gonadi per valutare l'attività endocrina della sostanza chimica in esame. Tali risposte diagnostiche includono essenzialmente la presenza di ovociti testicolari, l'iperplasia delle cellule di Leydig, una minore formazione di tuorlo, l'aumento degli spermatozoi e l'iperplasia periferica. Altre lesioni gonadiche, come l'atresia degli ovociti, la degenerazione testicolare e i cambiamenti di stadio, possono avere cause diverse. Il documento di orientamento sull'istopatologia gonadica dei pesci specifica le procedure da utilizzare per la dissezione, la fissazione, l'asportazione e la valutazione istopatologica delle gonadi (22).

DATI E RELAZIONE

Valutazione delle risposte dei biomarcatori mediante l'analisi della varianza (ANOVA)

49. Per individuare gli effetti potenziali di una sostanza chimica, si confrontano le risposte dei gruppi trattati e del gruppo di controllo mediante l'analisi della varianza (ANOVA). Se si utilizza un controllo contenente solvente, va effettuata un'adeguata analisi statistica del controllo con l'acqua di diluizione e del controllo contenente il solvente per ciascun endpoint. Si richiama la linea guida OCSE (2006C) (28) per gli orientamenti sul trattamento dei dati relativi al controllo con l'acqua di diluizione e col solvente nella successiva analisi statistica. Tutte le risposte biologiche ottenute vanno analizzate e valutate separatamente per ciascun sesso. Se non vengono soddisfatti i presupposti necessari per i metodi parametrici — distribuzione non normale (ad esempio al test di Shapiro-Wilk) o varianza eterogenea (al test di Bartlett o di Levene) — potrebbe essere necessario trasformare i dati per rendere omogenee le varianze prima di eseguire l'ANOVA oppure effettuare un'ANOVA ponderata. Il test (parametrico) di Dunnett per confronti multipli a coppia o il test (non parametrico) di Mann-Whitney con correzione di Bonferroni possono essere utilizzati per una relazione dose-risposta non monotona. Altri test statistici possono essere utilizzati (i test di Jonckheere-Terpstra o di Williams) se la relazione dose-risposta è approssimativamente monotona. L'appendice 8 riporta un diagramma di analisi statistica inteso ad aiutare la scelta del test statistico più appropriata. Il documento dell'OCSE sugli attuali metodi di analisi statistica dei dati sull'ecotossicità (28) fornisce ulteriori informazioni in materia.

Elaborazione di relazioni sui risultati della prova

50. I dati devono comprendere:

Infrastruttura utilizzata per la prova:

- personale responsabile dello studio e rispettive mansioni;
- ciascun laboratorio deve dimostrare di sapere utilizzare con adeguata competenza una serie di sostanze chimiche rappresentative.

Sostanza chimica in esame:

- caratterizzazione della sostanza chimica in esame;
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- metodo e frequenza di preparazione delle concentrazioni sperimentali;
- informazioni sulla stabilità e la biodegradabilità.

Solvente:

- caratterizzazione del solvente (natura, concentrazione impiegata);
- giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua).

Animali sperimentali:

- specie e ceppo;
- fornitore e stabilimento specifico del fornitore;
- età dei pesci all'inizio della prova e loro stato riproduttivo;
- informazioni dettagliate sulla procedura di acclimatazione degli animali;
- peso del pesce all'inizio dell'esposizione (calcolato a partire da un sottocampione proveniente dalla popolazione di pesci).

Condizioni sperimentali:

- metodo di prova utilizzato (tipo di prova, carico, densità della popolazione, ecc.);
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e loro portata;
- concentrazioni nominali di prova, misurazione settimanale delle concentrazioni delle soluzioni di prova e metodo analitico utilizzato, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche sperimentali e dimostrazione che le misure si riferiscono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;
- caratteristiche dell'acqua di diluizione (pH, durezza, alcalinità, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo, carbonio organico totale, solidi in sospensione e eventuali altre misurazioni effettuate);
- qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, durezza, temperatura e concentrazione di ossigeno disciolto;
- informazioni dettagliate sull'alimentazione (per esempio tipo di mangime, provenienza, quantità somministrata e frequenza) e analisi di eventuali contaminanti pertinenti (PCB, IPA e pesticidi organoclorurati).

Risultati:

- dimostrazione che i controlli soddisfano i criteri di validità della prova;
- dati sulla mortalità per ciascuna concentrazione di prova e ciascun controllo;
- tecniche di analisi statistica utilizzate, trattamento dei dati e giustificazione delle tecniche usate;
- dati sulle osservazioni biologiche della morfologia macroscopica, compresi i caratteri sessuali secondari, la produzione di uova e la VTG;
- risultati delle analisi di dati, presentati preferibilmente sotto forma di tabelle e grafici;
- incidenza delle eventuali reazioni anomale da parte dei pesci e di eventuali effetti visibili indotti dalla sostanza chimica in esame.

ORIENTAMENTI PER L'INTERPRETAZIONE E L'ACCETTAZIONE DEI RISULTATI

51. Questa sezione presenta alcune considerazioni che vanno tenute presenti ai fini dell'interpretazione dei risultati della prova per quanto riguarda i diversi parametri misurati. I risultati vanno interpretati con cautela nel caso in cui la sostanza chimica in esame sembri causare evidenti segni di tossicità o avere ripercussioni sullo stato generale dell'animale.
52. Nel determinare l'intervallo delle concentrazioni di prova, occorre fare attenzione a non superare la concentrazione massima tollerata per assicurare che i dati siano interpretati in modo attendibile. È importante che almeno uno dei trattamenti effettuati risulti nell'assenza di segnali di effetti tossici. I sintomi patologici e i segnali di tossicità devono fare l'oggetto di una valutazione e di una relazione dettagliata. È possibile, ad esempio, che la produzione di VTG nelle femmine sia compromessa anche dalla tossicità generale e dai meccanismi di azione tossica non connessi al sistema endocrino (epatotossicità, ad esempio). Tuttavia l'interpretazione degli effetti può essere rafforzata mediante altri livelli di trattamento i cui risultati non siano inficiati da tossicità sistemica.

53. Esistono alcuni parametri da considerare ai fini dell'accettazione dei risultati della prova. A titolo indicativo, i livelli di VTG vanno distinti nei gruppi di controllo di maschi e di femmine e devono essere separati da almeno tre ordini di grandezza nei ciprinidi e nel danio zebrato e di un ordine di grandezza nei medaka. Esempi della gamma dei valori rilevati nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo di trattamento sono disponibili nelle relazioni di validazione (1, 2, 3, 4). Valori elevati di VTG nei maschi di controllo possono compromettere la prestazione del saggio e la capacità di individuare antagonisti degli estrogeni di bassa potenza. Valori bassi di VTG nelle femmine di controllo possono compromettere la prestazione del saggio e la sua capacità di individuare inibitori dell'aromatasi e antagonisti degli estrogeni. Gli studi di validazione sono stati utilizzati per l'elaborazione di tali orientamenti.
54. La quantificazione della produzione di uova è soggetta a importanti variazioni [il coefficiente di variazione (CV) può variare da 20 a 60 %] che incidono sulla capacità del saggio di individuare un calo significativo della produzione di uova inferiore al 70 % quando il CV ha un valore pari o superiore al 50 %. Quando il CV è limitato a valori più bassi (circa il 20-30 %), il saggio avrà una potenza accettabile (80 %) per individuare una diminuzione del 40-50 % di produzione delle uova. Il disegno sperimentale utilizzato per i ciprinidi, che prevede quattro repliche per livello di trattamento, dovrebbe dare più potenza al parametro della fecondità rispetto a un disegno sperimentale che prevede solo 2 repliche.
55. Se un laboratorio non ha mai effettuato la prova in precedenza o se sono state introdotte modifiche significative (ad esempio, cambio di ceppo o di fornitore di pesci), si consiglia di effettuare uno studio per verificare la competenza tecnica. Si raccomanda di utilizzare sostanze che presentano una gamma di attività e di effetti su alcuni dei parametri misurati durante la prova. In pratica, ogni laboratorio deve essere invitato a fornire i propri dati di controllo storici per i maschi e le femmine, e ad effettuare una prova con una sostanza usata per i controlli positivi dell'attività estrogenica (ad esempio 17 β -estradiolo a 100 ng/l o un noto antagonista debole) che dia luogo ad un aumento della VTG nei maschi, una sostanza usata per i controlli positivi dell'inibizione dell'aromatasi (fadrozolo o procloraz a 300 μ g/l) con una conseguente diminuzione della VTG nelle femmine, e una sostanza usata per i controlli positivi dell'attività androgenica (17 β -trenbolone a 5 μ g/l, ad esempio) che dia luogo all'induzione di caratteri sessuali secondari nelle femmine dei ciprinidi e dei medaka. Tutti questi dati possono essere confrontati con i dati disponibili ricavati dagli studi di convalida (1, 2, 3) per garantire la competenza del laboratorio.
56. In generale, le misurazioni della VTG vanno considerate positive in caso di aumento statisticamente significativo della VTG nei maschi ($p < 0,05$) o di una diminuzione statisticamente significativa nelle femmine ($p < 0,05$), almeno alla concentrazione massima testata rispetto al gruppo di controllo e in assenza di segni di tossicità generale. Un risultato positivo è inoltre confermato dalla dimostrazione di una relazione biologicamente plausibile della curva dose-risposta. Come già menzionato, il calo della VTG può non essere interamente di origine endocrina; tuttavia, un risultato positivo va generalmente interpretato come una prova di attività del sistema endocrino in vivo e dovrebbe generalmente indurre ad avviare attività volte a ottenere ulteriori chiarimenti.
57. L'esame istopatologico gonadico può essere richiesto dalle autorità di regolamentazione al fine di determinare la capacità riproduttiva degli animali sperimentali e valutare il peso dell'evidenza dei risultati delle prove. Può non essere necessario eseguire l'esame istopatologico gonadico nei casi in cui la VTG o i caratteri sessuali secondari sono positivi (ossia quando la VTG aumenta o diminuisce o sono indotti caratteri sessuali secondari).

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.
- (7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L., *et al.* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
- (17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

- (21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
 - (22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.
 - (23) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
 - (24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - (25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
 - (26) Miles-Richardson S.R., *et al.* (1999). Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (27) Martinovic D., *et al.* (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.
 - (29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.
 - (30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.
-

Appendice 1

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

Sostanza chimica: sostanza o miscela

CV: coefficiente di variazione

ELISA: prova di immunoassorbimento enzimatico

HPG (Hypothalamic-pituitary-gonadal) Axis: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi

Tasso di carico: peso a umido dei pesci per volume di acqua

MTC: concentrazione massima tollerata, che rappresenta circa il 10 % della LC₅₀

Densità della popolazione: numero di pesci per volume di acqua

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

VTG: la vitellogenina è una lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare

Appendice 2

CONDIZIONI SPERIMENTALI PER LO SCREENING DEL SISTEMA ENDOCRINO DEI PESCI

1. Specie raccomandata	Fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Danio zebrato (<i>Danio rerio</i>)
2. Tipo di prova	A flusso continuo	A flusso continuo	A flusso continuo
3. Temperatura dell'acqua	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Qualità dell'illuminazione	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro)	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro)	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro)
5. Intensità luminosa	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio)
6. Periodo di illuminazione (le transizioni alba/crepuscolo sono facoltative, ma non considerate necessarie)	16 ore di luce, 8 ore di oscurità	12-16 ore di luce, 12-8 ore di oscurità	12-16 ore di luce, 12-8 ore di oscurità
7. Tasso di carico	<5 g per l	<5 g per l	<5 g per l
8. Volume della vasca sperimentale	10 l (minimo)	2 l (minimo)	5 l (minimo)
9. Volume della soluzione sperimentale	8 l (minimo)	1,5 l (minimo)	4 l (minimo)
10. Sostituzione del volume delle soluzioni sperimentali	Minimo 6 al giorno	Minimo 5 al giorno	Minimo 5 al giorno
11. Età degli organismi sperimentali	Cfr. paragrafo 21	Cfr. paragrafo 21	Cfr. paragrafo 21
12. Peso umido approssimativo del pesce adulto (g)	Femmine: 1,5 ± 20 % Maschi: 2,5 ± 20 %	Femmine: 0,35 ± 20 % Maschi: 0,35 ± 20 %	Femmine: 0,65 ± 20 % Maschi: 0,4 ± 20 %
13. Numero di pesci per vasca sperimentale	6 (2 maschi e 4 femmine)	6 (3 maschi e 3 femmine)	10 (5 maschi e 5 femmine)
14. Numero di trattamenti	= 3 (oltre ai controlli appropriati)	= 3 (oltre ai controlli appropriati)	= 3 (oltre ai controlli appropriati)
15. Numero di vasche per ciascun trattamento	4 minimo	4 minimo	2 minimo
16. Numero di pesci per concentrazione di prova	16 femmine adulte e 8 maschi (4 femmine and 2 maschi in ciascuna vasca di replica)	12 femmine adulte e 12 maschi (3 femmine and 3 maschi in ciascuna vasca di replica)	10 femmine adulte e 10 maschi (5 femmine and 5 maschi in ciascuna vasca di replica)

17. Regime alimentare	Adulti o naupli di artemia, vivi o congelati, due o tre volte al giorno (ad libitum), mangimi disponibili in commercio o una combinazione di questi elementi	Naupli di artemia due o tre volte al giorno (ad libitum), mangimi disponibili in commercio o una combinazione di questi elementi	Naupli di artemia due o tre volte al giorno (ad libitum), mangimi disponibili in commercio o una combinazione di questi elementi
18. Aerazione	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della saturazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della saturazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della saturazione dell'aria
19. Acqua di diluizione	Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita	Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita	Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita
20. Periodo di pre-esposizione	7-14 giorni (raccomandato)	7-14 giorni (raccomandato)	7-14 giorni (raccomandato)
21. Durata dell'esposizione chimica	21 giorni	21 giorni	21 giorni
22. Parametri biologici valutati (endpoint)	<ul style="list-style-type: none"> — sopravvivenza — comportamento — fecondità — caratteri sessuali secondari — VTG — istopatologia gonadica facoltativa 	<ul style="list-style-type: none"> — sopravvivenza — comportamento — fecondità — caratteri sessuali secondari — VTG — istopatologia gonadica facoltativa 	<ul style="list-style-type: none"> — sopravvivenza — comportamento — fecondità — VTG — istopatologia gonadica facoltativa
23. Criteri di validità della prova	Ossigeno disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione; temperatura media di 25 ± 2 °C; 90 % sopravvivenza dei pesci nei campioni di controllo; concentrazioni misurate della sostanza chimica in esame entro il 20 % dei valori medi misurati per ciascun livello di trattamento.	Ossigeno disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione; temperatura media di 25 ± 2 °C; 90 % sopravvivenza dei pesci nei campioni di controllo; concentrazioni misurate della sostanza chimica in esame entro il 20 % dei valori medi misurati per ciascun livello di trattamento.	Ossigeno disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione; temperatura media di 26 ± 2 °C; 90 % sopravvivenza dei pesci nei campioni di controllo; concentrazioni misurate della sostanza chimica in esame entro il 20 % dei valori medi misurati per ciascun livello di trattamento.

Appendice 3

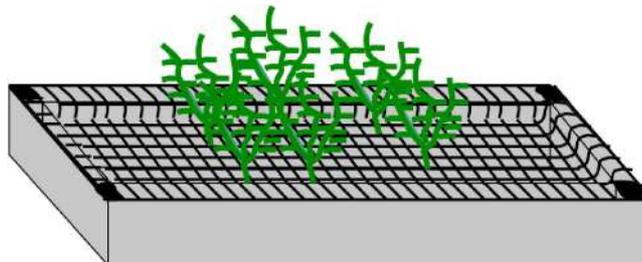
ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

COMPONENTE	CONCENTRAZIONI
Particolato	< 20mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

Appendice 4A

SUBSTRATO DI RIPRODUZIONE PER DANIO RERIO (DANIO ZEBRATO)

Piattaforma di riproduzione: piatto per strumenti in vetro, ad esempio di dimensioni $22 \times 15 \times 5,5$ (larghezza \times L \times h), coperto da una griglia amovibile di acciaio inossidabile (con maglie di 2 mm di larghezza). La griglia di copertura è posta ad un'altezza inferiore al bordo del piatto.



Il substrato di riproduzione è fissato sulla griglia, creando una struttura in cui i pesci possono muoversi. Allo scopo sono adatte, ad esempio, piante artificiali per acquario di plastica verde (NB: bisogna tener presente il possibile adsorbimento della sostanza chimica in esame sulla materia plastica). La plastica è lisciviata in un volume sufficiente di acqua calda e per un tempo sufficiente affinché nessuna sostanza sia rilasciata nell'acqua di prova. Se si utilizzano materiali in vetro, bisogna assicurare che i pesci non si feriscano o siano impediti nei movimenti durante le attività più vigorose.

La distanza tra il piatto e la parete della vasca deve essere di almeno 3 cm affinché la riproduzione non avvenga al di fuori del piatto. Le uova depositate sul piatto passano attraverso la griglia e possono essere prelevate 45-60 minuti dopo l'inizio dell'illuminazione. Le uova traslucide non aderiscono e possono facilmente essere contate alla luce trasversale. In presenza di cinque femmine per vasca, il numero di uova deposte può essere considerato basso se inferiore o pari a 20 al giorno, medio se compreso tra 20 e 100, e alto se superiore a 100. Il piatto di riproduzione è rimosso, le uova raccolte e la piattaforma di riproduzione reintrodotta nella vasca sperimentale, il più tardi possibile in serata o di prima mattina. La reintroduzione della piattaforma deve avvenire entro un'ora al massimo, perché altrimenti il segnale del substrato di riproduzione può indurre singoli accoppiamenti e una riproduzione al di fuori dei tempi controllati. Se la situazione richiede una successiva introduzione della piattaforma di riproduzione, occorre attendere almeno nove ore dopo l'inizio dell'illuminazione. A quest'ora tarda della giornata, la deposizione delle uova non è più indotta.

Appendice 4B

SUBSTRATO DI RIPRODUZIONE PER LA SPECIE *PIMEPHALES PROMELAS*

Due o tre piastre e piatti di riproduzione combinati in plastica/ceramica/vetro o acciaio inossidabile sono collocati in ciascuna vasca sperimentale (ad esempio un pezzo di grondaia di forma semicircolare grigia di 80 mm di lunghezza posto su una piastrina di metallo dotata di bordi rialzati, lunga 130 mm) (v. foto). È dimostrato che le piastrelle in PVC o in ceramica opportunamente trattate possono costituire idonei substrati di riproduzione (Thorpe et al, 2007).

Si raccomanda l'uso di piastrelle abrasive per migliorarne l'aderenza. Il piatto è inoltre munito di uno schermo di protezione per impedire che i pesci abbiano accesso alle uova depositate sul fondo a meno che sia stato dimostrato che le uova aderiscono efficacemente al substrato di riproduzione utilizzato.



La base è progettata per contenere tutte le uova che non aderiscono alla superficie della piastrina e che ricadrebbero quindi sul fondo della vasca (o le uova depositate direttamente sulla base di plastica piatta). Tutti i substrati di riproduzione sono lisciviati per almeno 12 ore in acqua di diluizione prima dell'uso.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

Appendice 5A

VALUTAZIONE DEI CARATTERI SESSUALI SECONDARI DI *PIMEPHALES PROMELAS* AI FINI DELL'INDIVIDUAZIONE DI DETERMINATE SOSTANZE ATTIVE A LIVELLO ENDOCRINO**Sintesi**

Negli esemplari adulti della specie *Pimephales promelas*, le caratteristiche fisiche che possono assumere rilevanza ai fini della sperimentazione sugli interferenti endocrini sono le seguenti: colore della livrea (chiaro/scuro), motivi di colorazione (presenza o assenza di bande verticali), forma del corpo (forma della testa e della regione toracica, distensione addominale) e caratteri sessuali secondari specifici della specie (numero e dimensioni dei tubercoli nuziali, dimensioni del cuscinetto dorsale e dell'ovopositore).

I tubercoli nuziali sono situati sulla testa (cuscinetto dorsale) nei maschi adulti riproduttori, e sono generalmente disposti in modo bilaterale e simmetrico (Jensen et al. 2001). Le femmine delle vasche di controllo e i giovani esemplari maschi e femmine non mostrano alcuno sviluppo di tubercoli (Jensen et al. 2001). È possibile individuare fino a otto singoli tubercoli attorno agli occhi e tra le narici degli esemplari maschi. I tubercoli più grandi e numerosi formano due linee parallele situate immediatamente al di sotto delle narici e sopra la bocca. In molti pesci si riscontrano gruppi di tubercoli sotto la mascella inferiore; vicino alla bocca se ne trova generalmente solo una coppia mentre la parte ventrale può comprendere fino a quattro tubercoli. Il numero di tubercoli raramente supera i 30 (range di 18-28; Jensen et al. 2001). I tubercoli più numerosi presentano un'unica struttura di forma tondeggiante, di altezza approssimativamente pari al raggio. Nella maggior parte dei maschi riproduttori, alcuni tubercoli sono talmente estesi e prominenti che è impossibile distinguerli gli uni dagli altri.

Alcuni tipi di interferenti endocrini possono provocare l'insorgere abnorme di caratteri sessuali secondari nel sesso opposto; ad esempio, gli antagonisti dei recettori degli androgeni, quali il 17 α -metiltestosterone o il 17 β -trenbolone, possono provocare l'insorgere di tubercoli nuziali nei ciprinidi femmina (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), mentre gli antagonisti dei recettori degli estrogeni possono ridurre il numero o la dimensione dei tubercoli nuziali nei maschi (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Segue una descrizione della caratterizzazione dei tubercoli nuziali in *Pimephales promelas* (ciprinidi), basata sul protocollo sperimentale utilizzato dal laboratorio dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (Duluth, MN). I prodotti e/o le attrezzature specifiche possono essere sostituiti da materiali comparabili disponibili.

L'utilizzazione di una lente di ingrandimento munita di illuminazione o microscopio binoculare da dissezione con illuminazione (3x) consente un'osservazione ottimale. Si osserverà il pesce in posizione dorsale, con la parte anteriore davanti (testa verso l'osservatore).

- Collocare il pesce in una piccola capsula di Petri (100 mm di diametro), sul ventre, parte anteriore verso l'avanti. Regolare il mirino per individuare i tubercoli. Far rotolare delicatamente il pesce da un lato all'altro per individuare le zone in cui si trovano i tubercoli. Contare e classificare i tubercoli.
- Ripetere l'osservazione sulla parte ventrale della testa, dopo aver collocato nella capsula di Petri il pesce sul dorso, parte anteriore verso l'avanti.
- Le osservazioni non dovrebbero superare i 2 minuti per ciascun esemplare.

Conteggio e classificazione dei tubercoli

Sono state individuate sei aree specifiche per la valutazione della presenza e dello sviluppo di tubercoli in *Pimephales promelas* (ciprinidi) adulti. È stato creato un modello per definire la localizzazione dei tubercoli e la quantità di tubercoli presenti (cfr. parte finale della presente appendice). Va registrato il numero di tubercoli che possono essere classificati come segue in funzione delle loro dimensioni: 0-nulla; 1-presente; 2-esteso e 3-prominente per ciascun organismo (figura 1).

Classe 0-: assenza di qualsiasi tubercolo. Classe 1- tubercolo presente: un tubercolo che ha un unico punto di altezza quasi uguale al raggio. Classe 2-tubercolo esteso: individuato dal tessuto somigliante ad un asterisco, di solito con un'ampia base radiale con solchi che partono dal centro. L'altezza dei tubercoli è spesso più frastagliata ma può talvolta essere leggermente arrotondata. Classe 3-tubercolo prominente: generalmente abbastanza ampio, di forma arrotondata, con una struttura meno ben definita. Questi tubercoli si agglomerano talvolta fino a formare un'unica massa lungo una zona o più zone (B, C e D, si veda la descrizione qui sotto). Il colore e la forma sono simili alla classe 2, ma sono talvolta piuttosto indeterminati. Questo sistema di classificazione permette generalmente di ottenere un risultato globale di <50 in un maschio normale di controllo che presenta un numero di tubercoli compreso tra 18 e 20 (Jensen et al. 2001).

Figura 1



Alcuni pesci possono presentare più tubercoli di quelli risultanti dalle caselle del modello per una particolare zona. In tal caso, codici supplementari possono essere indicati all'interno, a destra o a sinistra della casella. Il modello non deve pertanto necessariamente presentarsi simmetrico. Un'altra tecnica per indicare i tubercoli in coppia o riuniti verticalmente lungo il piano orizzontale della bocca potrebbe consistere nell'indicare codici a 2 cifre in un'unica casella.

Aree di localizzazione:

A — Tubercoli situati attorno agli occhi. Localizzati in zona da dorsale a ventrale intorno al bordo anteriore dell'occhio. Più comunemente nei maschi di controllo maturi, assenti nelle femmine di controllo, generalmente in coppia (uno presso ciascun occhio) o singoli nelle femmine esposte a androgeni.

B-Tubercoli situati tra le narici (pori canali sensoriali). Nei maschi di controllo sono generalmente in coppia a livelli di sviluppo superiori (2-estesi o 3-prominenti). Assenti nelle femmine di controllo ma talvolta presenti nelle femmine esposte a androgeni.

C — Tubercoli situati immediatamente davanti alle narici, parallelamente alla bocca. Generalmente estesi o prominenti nei maschi di controllo maturi. Presenti o estesi nei maschi meno sviluppati o nelle femmine esposte a androgeni.

D — Tubercoli situati parallelamente alla bocca. Generalmente classificati come "sviluppati" nei maschi di controllo. Assenti nelle femmine di controllo ma presenti nelle femmine esposte a androgeni.

E — Tubercoli situati sulla mascella inferiore, vicino alla bocca, in genere di piccole dimensioni e a coppie. Variabili nei maschi di controllo o trattati e nelle femmine trattate.

F — Tubercoli situati nella zona ventrale verso E. Generalmente piccoli e a coppie. Presenti nei maschi di controllo e nelle femmine esposte a androgeni.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Matrice dei tubercoli

ID _____

Data _____

Punteggio totale _____

Classificazione numerica

1-present

2- esteso

3- prominente

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1									
	D	X1									

	E	X1	X1		
	F	X1	X1	X1	X1

Appendice 5B

**VALUTAZIONE DEI CARATTERI SESSUALI SECONDARI NEL MEDAKA AL FINE DI INVIDIDUARE
ALCUNE SOSTANZE CHIMICHE CON ATTIVITÀ ENDOCRINA**

Di seguito è descritta la misurazione dei processi papillari (*), che costituiscono i caratteri sessuali secondari nel medaka (*Oryzias latipes*).

- (1) Dopo l'escissione del fegato (appendice 6) la carcassa è introdotta in un tubo conico contenente circa 10 ml di formalina tamponata al 10 % (testa in alto, coda in basso). Se la gonade è fissata in una soluzione diversa dalla formalina tamponata al 10 %, praticare con un rasoio un taglio trasversale della carcassa tra la regione anteriore della pinna anale e l'ano, avendo cura di non rovinare il gonoporo e la gonade stessa (figura 3). Collocare la parte del corpo del pesce comprendente la testa nella soluzione fissativa per conservare la gonade, e la parte del corpo con la coda in formalina tamponata al 10 % come descritto sopra.
- (2) Dopo aver collocato il pesce in formalina tamponata al 10 %, afferrare con pinzette la regione anteriore della pinna anale e piegarla per una trentina di secondi affinché la pinna anale rimanga aperta. Tenendo la pinna anale con le pinzette, afferrare alcuni raggi della pinna nella regione anteriore avendo cura di non danneggiare i processi papillari.
- (3) Dopo aver tenuto la pinna anale aperta per una trentina di secondi, collocare il pesce in formalina tamponata al 10 % a temperatura ambiente fino alla misurazione dei processi papillari (la misurazione va effettuata dopo almeno 24 ore).

Misurazione

- (1) Dopo aver fissato il pesce in formalina tamponata al 10 % per almeno 24 ore, rimuovere la carcassa dal tubo conico e asciugare la formalina con carta da filtro (o carta assorbente).
- (2) Collocare il pesce con l'addome verso l'alto. Tagliare poi accuratamente la pinna anale con forbicine da dissezione (è preferibile tagliare la pinna anale con un pezzettino di pterigioforo).
- (3) Afferrare con le pinzette la regione anteriore della pinna anale, asportata e disporla su un vetrino con qualche goccia d'acqua. Coprire quindi la pinna anale con un vetrino coprioggetti. Nell'afferrare la pinna anale con le pinzette, fare attenzione a non danneggiare i processi papillari.
- (4) Contare il numero di segmenti di raggio che presentano processi papillari utilizzando il contatore di un microscopio biologico (microscopio diritto o rovesciato). Si riconoscono i processi papillari quando è visibile una piccola formazione di processi papillari sul lato posteriore dei segmenti di raggio. Registrare in una tabella il numero di segmenti di raggio che presentano processi papillari in ciascun raggio di pinna (ad es. primo raggio: 0, secondo raggio: 10, terzo raggio: 12, ecc.) e registrarne la somma in un foglio Excel per ciascun esemplare. Se necessario, fotografare la pinna anale e contare il numero di segmenti di raggio che presentano processi papillari sulla foto.
- (5) Dopo la misurazione, riporre la pinna anale nel tubo conico descritto al punto (1) e conservarla.

(*) I processi papillari sono generalmente presenti soltanto nei maschi adulti e si situano tra il secondo e il settimo/ottavo raggio della pinna contando a partire dall'estremità posteriore della pinna anale (figure 1 e 2). Tuttavia è raro che i processi siano presenti sul primo raggio della pinna contando a partire dall'estremità posteriore della pinna anale. La procedura operativa standard (POS) consente di misurare i processi presenti sul primo raggio della pinna (il numero del raggio si conta a partire dall'estremità posteriore della pinna anale nella presente POS).

Figura 1.

Differenze sessuali in base a forma e dimensioni della pinna anale. A, maschio; B, femmina. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

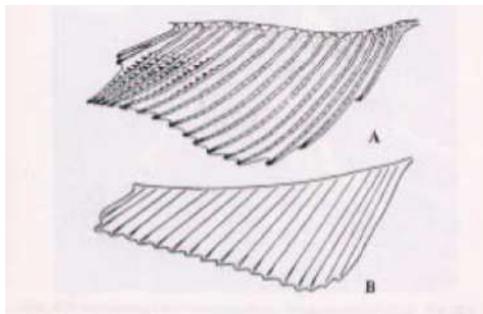


Figura 2.

A, Processi che avvengono sui segmenti congiunti del raggio della pinna anale. J.P. (*joint plate*), segmento congiunto; A.S., spazio assiale; P., processo. B, estremità distale della pinna anale. Gli attinotrichi (*Act.*) si trovano sulle punte. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

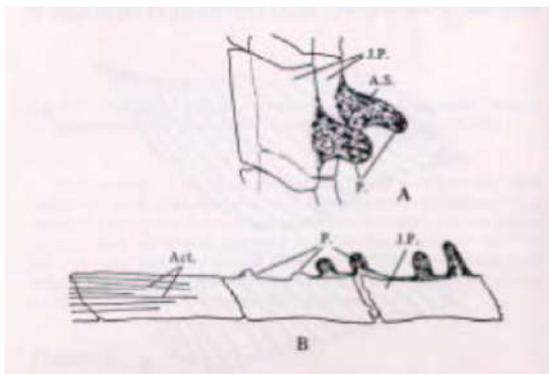
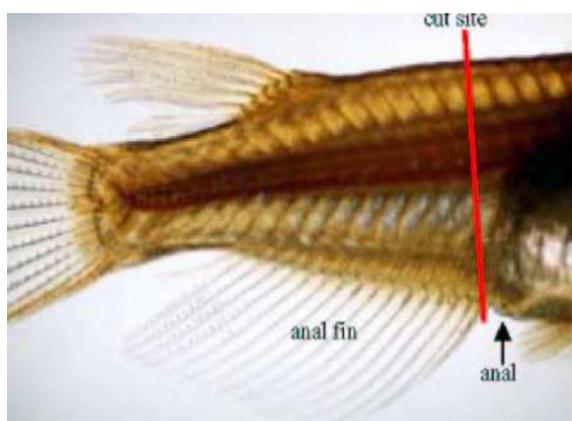


Figura 3.

Fotografia del corpo del pesce che mostra la linea di taglio quando la gonade è fissata in una soluzione diversa dalla formalina tamponata al 10 %. In tal caso, il resto del corpo è tagliato fra la regione anteriore della pinna anale e l'ano mediante rasoio (linea rossa). La testa è riposta nella soluzione fissativa per conservare la gonade, e la coda in formalina tamponata al 10 %.



Appendice 6

PROCEDURE RACCOMANDATE PER I PRELIEVI EFFETTUATI AI FINI DELL'ANALISI DELLA VTG

Si avrà cura di evitare la contaminazione incrociata tra i campioni di VTG dei maschi e delle femmine.

Procedura 1A: Ciprinidi della specie *Pimephales promelas*, prelievo di sangue dall'arteria/vena caudale

Dopo anestesia, il peduncolo caudale è parzialmente reciso con un bisturi ed è prelevato un campione di sangue dall'arteria/vena caudale mediante un tubo capillare per microematocrito eparinato. Dopo il prelievo di sangue, il plasma viene rapidamente separato tramite centrifugazione a temperatura ambiente per 3 minuti a 15 000 g (o a una temperatura di 4 °C per 10 minuti a 15 000 g). A seguito della centrifugazione, si può determinare la percentuale di ematocrito. Il plasma viene successivamente ritirato dal tubo microematocrito e immagazzinato in un tubo da centrifuga con 0,13 unità di aprotinina (un inibitore di proteasi) a - 80 °C fino alla misurazione della VTG. Secondo la dimensione del Ciprinide (che dipende dal sesso), i volumi di plasma prelevabili sono generalmente di 5-60 ml per individuo (Jensen et al. 2001).

Procedura 1 B: Ciprinidi della specie *Pimephales promelas*, prelievo di sangue mediante puntura cardiaca

In alternativa, è possibile effettuare un prelievo di sangue con puntura cardiaca mediante siringa eparinizzata (1 000 unità di eparina per ml). Il sangue è trasferito in provette Eppendorf (mantenute nel ghiaccio) e quindi centrifugato (5 minuti a 7 000 g a temperatura ambiente). Il plasma va trasferito in provette Eppendorf pulite (in varie porzioni se il volume di plasma lo consente) e successivamente congelato rapidamente a - 80 °C fino all'analisi (Panter et al., 1998).

Procedura 2A: Escissione del fegato in *Oryzias latipes* (medaka)

Rimozione dei pesci oggetto della prova dalla vasca sperimentale

- (1) I pesci oggetto della prova sono rimossi dalla vasca sperimentale mediante un retino. Si faccia attenzione a non far cadere i pesci in un'altra vasca sperimentale.
- (2) In linea di principio, i pesci oggetto della prova vanno rimossi nell'ordine seguente: controllo, vasca di controllo contenente il solvente (se del caso), concentrazione minima, concentrazione media, concentrazione massima e controllo positivo. Inoltre, tutti i maschi vanno rimossi dalla vasca sperimentale prima delle femmine.
- (3) Il sesso di ogni esemplare di prova è identificato in base ai caratteri sessuali secondari esterni (forma della pinna anale, ad esempio).
- (4) Collocare i pesci in un contenitore per il trasporto fino alla postazione di lavoro per l'escissione del fegato. Verificare le etichette della vasca sperimentale e del contenitore di trasporto a fini di accuratezza e per confermare che il numero di pesci rimossi dalla vasca sperimentale e il numero di pesci rimasti nella vasca sperimentale corrispondano alle previsioni.
- (5) Se il sesso non può essere identificato tramite l'aspetto esterno del pesce, rimuovere tutti i pesci dalla vasca sperimentale. In tal caso, il sesso è identificato mediante osservazione della gonade o dei caratteri sessuali secondari mediante microscopio stereoscopico.

Escissione del fegato

- (1) Trasferire i pesci oggetto della prova dal contenitore di trasporto alla soluzione anestetica mediante retino.
- (2) Dopo l'anestesia, i pesci oggetto della prova sono trasferiti sulla carta da filtro (o carta assorbente) con pinzette (di tipo comune). Nell'afferrare i pesci, applicare le pinzette ai lati della testa per evitare di rompere la coda.
- (3) Asciugare l'acqua dalla superficie del pesce oggetto della prova sulla carta da filtro (o carta assorbente).

- (4) Collocare il pesce con l'addome verso l'alto. Praticare quindi una piccola incisione trasversale tra la regione ventrale della nuca e la regione centrale dell'addome mediante forbici da dissezione.
- (5) Introdurre le forbici da dissezione nella piccola incisione e praticare un'incisione lungo la linea mediana dell'addome, da un punto caudale rispetto al manto branchiale fino al lato cranico dell'ano. Fare attenzione a non introdurre le forbici da dissezione troppo in profondità per non rovinare il fegato e la gonade.
- (6) Svolgere le seguenti operazioni al microscopio stereoscopico.
- (7) Porre i pesci sul dorso sulla carta assorbente (o in una capsula di Petri di vetro o su una piastra di vetro).
- (8) Allargare le pareti della cavità addominale mediante pinzette di precisione ed esporre gli organi interni. È anche possibile esporre gli organi interni eliminando una delle pareti della cavità addominale se necessario.
- (9) Esporre la parte di collegamento tra il fegato e la cistifellea utilizzando un altro paio di pinzette di precisione. Afferrare quindi il dotto biliare e recidere la cistifellea, facendo attenzione a non romperla.
- (10) Afferrare l'esofago e asportare il tratto gastrointestinale dal fegato con lo stesso metodo. Fare attenzione a non far colare il contenuto del tratto gastrointestinale. Recidere il tratto gastrointestinale caudale dall'ano e rimuoverlo dalla cavità addominale.
- (11) Eliminare la massa dei tessuti adiposi ed altri tessuti situati alla periferia del fegato, avendo cura di non rovinare il fegato.
- (12) Afferrare la zona della porta epatica con le pinzette di precisione e rimuovere il fegato dalla cavità addominale.
- (13) Porre il fegato sulla piastra di vetro. Con le pinzette di precisione, rimuovere eventuale altro tessuto adiposo o tessuto estraneo (rivestimento della parete addominale, ad esempio), se del caso, dalla superficie del fegato.
- (14) Pesare il fegato mediante una bilancia di precisione elettronica utilizzando come tara una microprovetta da 1,5 ml. Annotare il valore sul foglio di lavoro (precisione: 0,1 mg). Confermare le informazioni identificative sull'etichetta della microprovetta.
- (15) Tappare la microprovetta contenente il fegato e conservarla in un supporto di raffreddamento (o un supporto ghiacciato).
- (16) Dopo ogni escissione di fegato, pulire gli strumenti di dissezione oppure sostituirli con strumenti puliti.
- (17) Rimuovere nello stesso modo il fegato da tutti i pesci presenti nel contenitore di trasporto.
- (18) Dopo l'escissione del fegato di tutti i pesci presenti nel contenitore (cioè tutti i maschi o tutte le femmine di una vasca sperimentale), porre tutti gli esemplari di fegato su supporti per tubi muniti di etichetta di identificazione e conservarli in congelatore. Se i fegati subiranno un pre-trattamento subito dopo l'escissione, gli esemplari devono essere trasportati fino alla prossima postazione di lavoro in un supporto di raffreddamento (o un supporto ghiacciato).

Dopo l'escissione del fegato, la carcassa è pronta per l'esame istologico delle gonadi e la misurazione dei caratteri sessuali secondari.

Campioni

Conservare i campioni di fegato prelevati dai pesci oggetto di prova ad una temperatura di ≤ -70 °C se non utilizzati per il pre-trattamento subito dopo l'escissione.

Figura 1

Praticare con le forbici un taglio nella parte anteriore delle pinne pettorali.

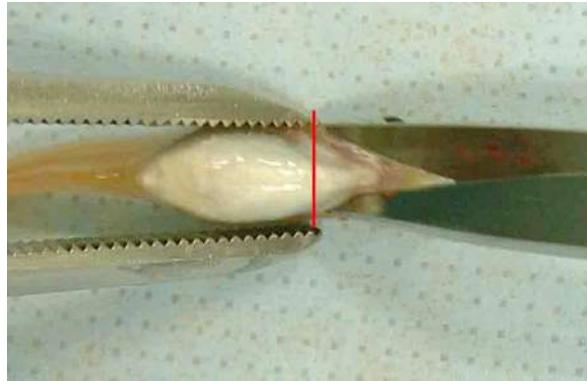


Figura 2

Tagliare la linea mediana dell'addome con forbici da un punto situato a circa 2 mm dal cranio fino all'ano.



Figura 3

Allargare le pareti addominali con pinzette per esporre il fegato e gli altri organi interni
(in alternativa le pareti addominali possono essere pinzate lateralmente).

La freccia indica il fegato.

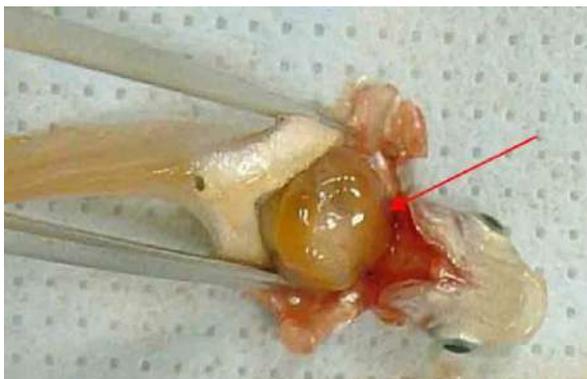


Figura 4

Il fegato è dissezionato e rimosso mediante le pinzette.



Figura 5

Gli intestini sono rimossi delicatamente con le pinzette.

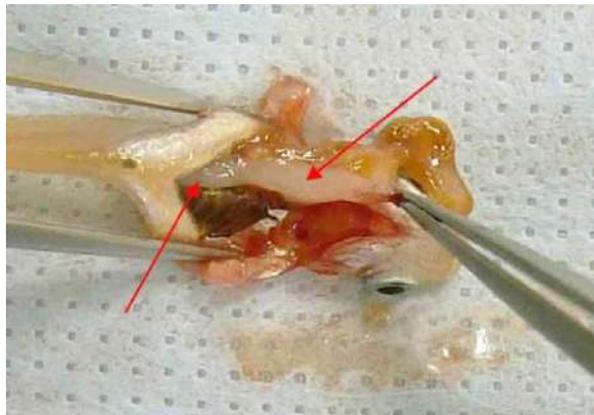


Figura 6

Le due estremità degli intestini e gli attacchi del mesenterio sono separati con le forbici.

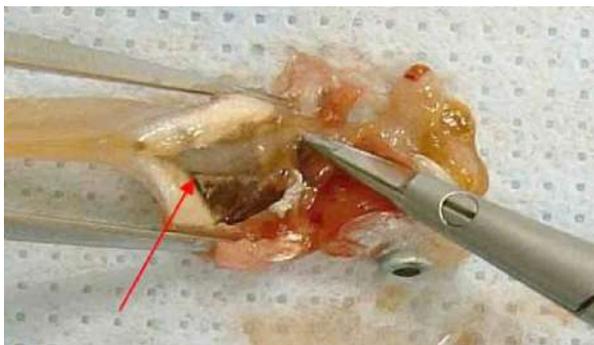


Figura 7 (femmina)

La procedura è identica per le femmine.

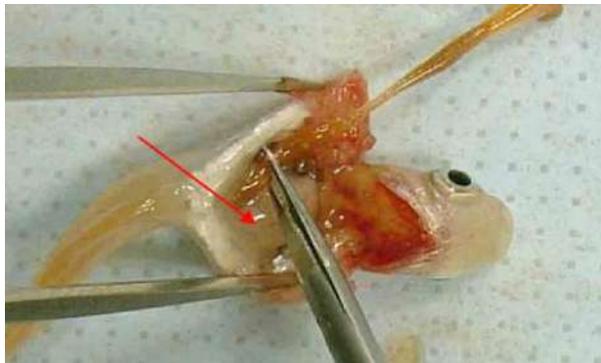


Figura 8

Procedura completata.



Procedura 2B: Pre-trattamento del fegato per l'analisi della vitellogenina in *Oryzias latipes* (medaka)

Ritirare la bottiglia contenente il tampone di omogeneizzazione dal kit ELISA e raffreddarla con ghiaccio tritato (temperatura della soluzione: ≤ 4 °C). Se si usa un tampone di omogeneizzazione proveniente da un kit EnBio ELISA, scongelare la soluzione a temperatura ambiente e quindi raffreddare la bottiglia con ghiaccio tritato.

Calcolare il volume di tampone di omogeneizzazione per il fegato in base al peso di quest'ultimo (aggiungere 50 μ l di tampone di omogeneizzazione per mg di fegato). Per esempio: se il fegato pesa 4,5 mg, il volume del tampone di omogeneizzazione per il fegato è di 225 μ l. Stilare un elenco dei volumi di tampone di omogeneizzazione per tutti i fegati.

Preparazione del fegato per il pre-trattamento

- (1) Ritirare la microprovetta da 1,5 ml contenente il fegato dal congelatore immediatamente prima del pre-trattamento.
- (2) Il pre-trattamento del fegato dei maschi è effettuato prima di quello delle femmine per evitare contaminazioni della vitellogenina. Inoltre, il pre-trattamento dei gruppi di prova è effettuato nel seguente ordine: controllo, vasca di controllo contenente il solvente (se del caso), concentrazione minima, concentrazione media, concentrazione massima e controllo positivo.

- (3) Il numero di microprovette da 1,5 ml contenenti i campioni epatici tolti dal congelatore in un dato momento non deve superare il numero di quelli che possono essere centrifugati subito.
- (4) Porre le microprovette da 1,5 ml contenenti i campioni epatici nel supporto ghiacciato secondo l'ordine di numerazione degli esemplari (non è necessario scongelare il fegato).

Svolgimento del pre-trattamento

1) Aggiunta del tampone di omogenato

Verificare nell'elenco il volume di tampone di omogeneizzazione da utilizzare per un determinato campione di fegato e aggiustare la micropipetta (intervallo dei volumi: 100-1 000 μ l) al volume adeguato. Attaccare un puntale pulito alla micropipetta.

Rimuovere il tampone di omogeneizzazione dalla bottiglia del reagente e aggiungere il tampone nella microprovetta da 1,5 ml contenente il fegato.

Aggiungere il tampone di omogeneizzazione in tutte le microprovette da 1,5 ml contenenti i campioni di fegato seguendo la procedura sopra descritta. Non è necessario sostituire il puntale della micropipetta con uno nuovo, a meno che non sia contaminato o si sospetti possa esserlo.

2) Omogeneizzazione del fegato

- Attaccare un nuovo pestello di omogeneizzazione all'omogeneizzatore della microprovetta.
- Introdurre il pestello nella microprovetta da 1,5 ml. Tenere l'omogeneizzatore in modo da pressare il fegato tra la superficie del pestello e la parete interna della microprovetta.
- Attivare l'omogeneizzatore per 10-20 secondi. Raffreddare la microprovetta con ghiaccio tritato durante l'operazione.
- Ritirare il pestello dalla microprovetta e lasciar riposare per una decina di secondi. Procedere quindi a un'ispezione visiva dello stato della sospensione.
- Se si osservano pezzi di fegato nella sospensione, ripetere le operazioni (3) e (4) per ottenere un omogenato epatico soddisfacente.
- Conservare al fresco l'omogenato epatico in sospensione nel supporto ghiacciato fino alla sua centrifugazione.
- Utilizzare un pestello nuovo per ciascun omogenato.
- Omogeneizzare tutti i fegati con tampone di omogeneizzazione seguendo la procedura sopra descritta.

3) Centrifugazione dell'omogenato epatico in sospensione

- Verificare che la temperatura della centrifuga refrigerata sia ≤ 5 °C.
- Introdurre le microprovette da 1,5 ml contenenti l'omogenato epatico in sospensione nella centrifuga refrigerata (riequilibrare se necessario).
- Centrifugare l'omogenato epatico in sospensione per 10 minuti a 13 000 g ad una temperatura ≤ 5 °C. Tuttavia, se i supernatanti sono adeguatamente separati, la forza centrifuga e la durata di centrifugazione possono essere adeguate come necessario.
- Dopo la centrifugazione, verificare che i supernatanti siano adeguatamente separati (superficie: lipidi, strato intermedio: supernatante, strato inferiore: tessuto epatico). Se la separazione non è adeguata, ripetere la centrifugazione della sospensione alle stesse condizioni.
- Rimuovere tutti i campioni dalla centrifuga refrigerata e trasferirli nel supporto ghiacciato secondo l'ordine di numerazione degli esemplari. Prestare attenzione a non rimettere in sospensione gli strati separati dopo la centrifugazione.

4) Raccolta del supernatante

- Riporre quattro microprovette da 0,5 ml per la conservazione del supernatante nel supporto per provette.
- Raccogliere 30 µl di ciascun supernatante (che forma lo strato intermedio dopo la separazione) con la micropipetta e versarli in una microprovetta da 0,5 ml, avendo cura di non raccogliere i lipidi dalla superficie o il tessuto epatico dal fondo.
- Raccogliere il supernatante e versarlo in altre due microprovette da 0,5 ml seguendo la procedura sopra descritta.
- Raccogliere il resto del supernatante con la micropipetta (se possibile: ≥ 100 µl). Versare quindi il supernatante nella rimanente microprovetta da 0,5 ml, avendo cura di non raccogliere i lipidi dalla superficie o il tessuto epatico dal fondo.
- Tappare la microprovetta da 0,5 ml e registrare il volume del supernatante sull'etichetta. Trasferire immediatamente le microprovette sul supporto ghiacciato.
- Sostituire il puntale della micropipetta con uno nuovo per ciascun supernatante. Se una grande quantità di grassi rimane attaccata al puntale, sostituirlo immediatamente con uno nuovo per evitare la contaminazione dell'estratto di fegato con il grasso.
- Versare tutto il supernatante centrifugato in quattro microprovette da 0,5 ml seguendo la procedura sopra descritta.
- Dopo aver versato il supernatante nelle microprovette da 0,5 ml, riporre tutte sul relativo supporto con l'etichetta di identificazione e inserirle immediatamente nel congelatore. Se le concentrazioni di VTG sono misurate subito dopo il pre-trattamento, conservare al fresco una microprovetta da 0,5 ml (contenente 30 µl di supernatante) nel relativo supporto e trasferirla alla postazione di lavoro in cui sarà condotta l'analisi ELISA. In tal caso, riporre le microprovette rimanenti nei supporti e metterle nel congelatore.
- Dopo la raccolta del supernatante, eliminare il liquido residuale in modo adeguato.

Conservazione degli esemplari

Conservare le microprovette da 0,5 ml contenenti il supernatante dell'omogenato epatico a una temperatura ≤ -70 °C fino all'esecuzione dell'analisi ELISA.

Procedura 3A: Prelievo di campioni ematici dall'arteria/vena caudale nel danio zebrato

Immediatamente dopo l'anestesia sezionare trasversalmente il peduncolo caudale ed eseguire un prelievo ematico dall'arteria/vena caudale mediante tubo capillare microematocrito eparinato. I volumi di sangue raccolti variano tra 5 e 15 microlitri in funzione della dimensione del pesce. Un volume equivalente di tampone di aprotinina [6 microgrammi/ml di soluzione salina tamponata al fosfato (PBS)] è aggiunto al tubo capillare e il plasma è separato dal sangue mediante centrifugazione (5 minuti a 600 g). Il plasma è raccolto in provette e conservato a -20 °C fino alla misurazione della VTG o di altre proteine di interesse.

Procedura 3B: Prelievo di sangue mediante puntura cardiaca nel danio zebrato

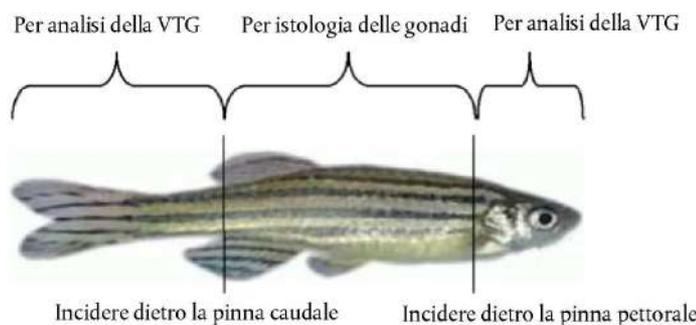
Per evitare la coagulazione del sangue e la degradazione della proteina, i campioni sono prelevati in una soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) contenente eparina (1 000 unità/ml) e aprotinina, inibitore di proteasi (2 TIU/ml). Come ingredienti del tampone, si raccomanda di utilizzare eparina, sale ammonico e aprotinina liofilizzata. Per il prelievo ematico, si raccomanda di utilizzare una siringa (1 ml) con ago fisso sottile (Braun Omnikan-F, ad esempio). La siringa va preriempita con il tampone (circa 100 microlitri) per eluire completamente i piccoli volumi sanguigni da ciascun pesce. I prelievi di sangue avvengono mediante puntura cardiaca. Inizialmente il pesce viene anestetizzato con MS-222 (100 mg/l). Un'anestesia adeguata consente di distinguere il battito cardiaco del danio zebrato. Durante la puntura cardiaca, mantenere una pressione leggera sullo stantuffo della siringa. I volumi sanguigni che possono essere raccolti variano tra 20 e 40 microlitri. Dopo la puntura cardiaca, la miscela sangue/tampone è versata nella provetta. Il plasma è separato dal sangue mediante centrifugazione (20 minuti a 5 000 g) e dovrebbe essere conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Procedura 3C POS: omogeneizzazione della testa e della coda nel danio zebrato

1. I pesci sono anestetizzati e soppressi in modo incruento come da protocollo sperimentale.
2. La testa e la coda del pesce sono tagliate come indicato da figura 1.

Importante: *Tutti gli strumenti da dissezione e il tagliere vanno lavati e puliti correttamente (ad. es. con etanolo al 96 %) tra il trattamento di ciascun pesce e il successivo per evitare la "contaminazione da vitellogenina" tra le femmine o i maschi trattati e i maschi non trattati.*

Figura 1



3. La testa e la coda di ciascun pesce sono pesate, insieme, con precisione fino al mg.
4. Dopo essere state pesate, tali parti sono collocate in apposite provette (ad es. provette Eppendorf da 1,5 ml) e conservate ad una temperatura di -80°C fino alla loro omogeneizzazione oppure direttamente omogeneizzate in ghiaccio con 2 pestelli in plastica (possono essere adottati altri metodi purché implicino l'utilizzo di ghiaccio e ne risulti una massa omogenea). Importante: *Le provette vanno numerate in modo appropriato di modo che la testa e la coda del pesce possano essere collegate alla sezione corrispondente del corpo utilizzata per l'esame istologico delle gonadi.*
5. Dopo aver ottenuto una massa omogenea, aggiungere un **tampone di omogeneizzazione** (*) ghiacciato del peso pari a 4 volte il peso dei tessuti. Continuare a lavorare di pestello fino a che la miscela non risulti omogenea. Nota importante: *Utilizzare un nuovo pestello per ciascun pesce.*
6. I campioni sono collocati nel ghiaccio fino a centrifugazione a 50 000 g per 30 minuti e ad una temperatura di 4°C .
7. Con l'uso di una pipetta ripartire porzioni di 20 μl di supernatante in **almeno due** provette facendo penetrare la punta della pipetta al di sotto dello strato lipidico in superficie ed aspirando con attenzione il supernatante privo di parti grasse e di precipitato.
8. Le provette sono conservate ad una temperatura di -80°C fino al loro utilizzo.

(*) Tampone di omogeneizzazione:

- 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % cocktail di inibitori di proteasi (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl cocktail di inibitori di proteasi.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) e.g. da Bie & Berntsen, Danimarca.
- Cocktail di inibitori di proteasi: da Sigma (per i tessuti di mammiferi) n. del prodotto P 8340.

NOTA: Il tampone di omogeneizzazione va utilizzato il giorno stesso in cui è preparato. Mantenere nel ghiaccio durante l'uso.

*Appendice 7***CAMPIONI FORTIFICATI DI VITELLOGENINA E STANDARD DI RIFERIMENTO INTER-PROVA**

Ogni giorno in cui sono effettuate prove sulla VTG, è analizzato un campione fortificato in applicazione di uno standard di riferimento inter-prova. La VTG utilizzata per preparare lo standard di riferimento inter-prova proverrà da un lotto diverso da quello utilizzato per preparare gli standard di calibrazione per la prova in corso.

Per preparare il campione fortificato, si aggiunge una quantità nota di standard inter-prova ad un campione di plasma di esemplare maschio di controllo. Il campione sarà ulteriormente fortificato fino a raggiungere una concentrazione di VTG da 10 a 100 volte superiore alla concentrazione di VTG prevista nei maschi di controllo. Il campione di plasma di esemplare maschio di controllo da fortificare può provenire da un unico esemplare o da più esemplari.

Un sottocampione del plasma di un esemplare maschio di controllo non fortificato sarà analizzato in almeno due pozzetti in duplicato. Anche il campione fortificato va analizzato in almeno due pozzetti in duplicato. Al fine di determinare la concentrazione prevista, la quantità media di VTG di entrambi i campioni non fortificati di plasma di maschio di controllo viene aggiunta alla quantità calcolata di VTG aggiunta per arricchire i campioni. Il rapporto tra la concentrazione prevista e la concentrazione misurata dovrebbe essere rilevato assieme ai risultati dei singoli test effettuati lo stesso giorno.

DIAGRAMMA DECISIONALE PER L'ANALISI STATISTICA

