

C.49 Prova di tossicità acuta sugli embrioni di pesci

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 236 (2013). Descrive una prova di tossicità acuta sugli embrioni di danio zebrato (*Danio rerio*) intesa a determinare la tossicità acuta di sostanze chimiche sui pesci allo stadio embrionale. Basata sugli studi e sulle attività di convalida effettuate sul danio zebrato (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11) (12)(13)(14), la prova si è dimostrata valida per saggiare un'ampia serie di sostanze chimiche caratterizzate da meccanismi d'azione, solubilità, volatilità e idrofobia diversi (cfr. paragrafi 15 e 16).
2. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Si espongono per 96 ore alla sostanza chimica in esame uova di danio zebrato appena fecondate. Ogni 24 ore si registra l'osservazione di uno o più dei quattro endpoint apicali indicatori di letalità (6): i) coagulazione delle uova fecondate, ii) mancata formazione dei somiti, iii) mancato distacco dell'abbozzo caudale dal sacco vitellino, iv) assenza di battito cardiaco. Al termine del periodo di esposizione si determina la tossicità acuta in base all'esito positivo di uno dei quattro endpoint apicali registrati e si calcola l' LC_{50} .

CONSIDERAZIONI INIZIALI

4. La formula strutturale, il peso molecolare, la purezza, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a , il K_{ow} , l'idrosolubilità, la pressione di vapore e i risultati di una prova di pronta biodegradabilità (metodo di prova C.4 (17) o C. 29 (18)) sono informazioni utili sulle proprietà della sostanza. La solubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica il rischio di perdite per evaporazione della sostanza chimica durante la prova. Occorre inoltre disporre di un metodo d'analisi affidabile per la determinazione quantitativa della sostanza nelle soluzioni di prova, la cui precisione e il limite di quantificazione siano noti e descritti in letteratura.
5. Se il presente metodo è utilizzato per saggiare una miscela, la composizione di quest'ultima dovrebbe essere per quanto possibile caratterizzata, in particolare, mediante l'identità chimica dei suoi componenti, i quantitativi in cui sono presenti e le loro proprietà in quanto sostanze (cfr. paragrafo 4). Prima di utilizzare il metodo di prova per saggiare una miscela a fini regolamentari, occorre verificare se genererà risultati accettabili per il fine regolamentare previsto.
6. Per quanto riguarda le sostanze che possono essere attivate metabolicamente, è comprovato che gli embrioni di danio zebrato hanno capacità di biotrasformazione (19) (20) (21) (22). Tuttavia, la capacità metabolica degli embrioni non è sempre simile a quella dei pesci giovani o adulti; ad esempio, le proprietà protossiche dell'alcol allilico (9) non sono state riconosciute dal presente metodo di prova. Pertanto, se vi sono elementi indicanti l'eventualità che i metaboliti o altri prodotti di trasformazione pertinenti siano più tossici del composto di partenza, si raccomanda di eseguire la prova con tali metaboliti/prodotti di trasformazione e di utilizzare anche questi risultati al momento di trarre le conclusioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame; oppure si raccomanda di eseguire un'altra prova che tenga meglio conto del metabolismo.
7. Si presume che gli embrioni non siano sensibili alle sostanze con peso molecolare $\geq 3kDa$, la cui struttura molecolare è molto voluminosa, o quelle che ritardano la schiusa, rischiando di impedire o ridurre l'esposizione post schiusa, a causa della modesta biodisponibilità; potrebbero pertanto essere più appropriate altre prove di tossicità.

VALIDITÀ DELLA PROVA

8. Affinché i risultati della prova siano validi devono essere soddisfatti i seguenti criteri:
 - a) tasso globale di fecondazione delle uova raccolte pari o superiore al 70 % del lotto sottoposto a prova;

- b) temperatura dell'acqua costante a 26 ± 1 °C nei recipienti di prova in ogni momento della prova;
- c) sopravvivenza complessiva degli embrioni nel controllo negativo (acqua di diluizione) e, se del caso, nel controllo del solvente pari o superiore al 90 % alla fine del periodo di esposizione di 96 ore;
- d) mortalità minima del 30 % nel controllo positivo (ad esempio, per il danio zebrato, esposizione a 4,0 mg/l di 3,4-dicloroanilina) alla fine del periodo di esposizione di 96 ore;
- e) tasso di schiusa nel controllo negativo (e nel controllo del solvente, se del caso) superiore all'80 % alla fine del periodo di esposizione di 96 ore;
- f) concentrazione dell'ossigeno disciolto nel controllo negativo e nelle concentrazioni massima di prova pari o superiore all'80 % del valore di saturazione alla fine del periodo di esposizione di 96 ore.

DESCRIZIONE DEL METODO

9. Una sintesi delle modalità di mantenimento e delle condizioni sperimentali raccomandate figura nell'appendice 2.

Strumentazione

10. È necessaria la seguente strumentazione:
- a) vasche in materiale chimicamente inerte (ad esempio, vetro) e di capacità adeguata al carico raccomandato (cfr. paragrafo 14 Mantenimento dei pesci riproduttori);
 - b) microscopio rovesciato e/o binoculare con capacità d'ingrandimento di almeno 80x. Se la temperatura del locale utilizzato per registrare le osservazioni non può essere regolata a 26 ± 1 °C, è necessario un tavolino riscaldante a movimento incrociato o altri metodi che mantengano costante la temperatura;
 - c) recipienti di prova; ad esempio, piastre standard a 24 pozzetti con una profondità di circa 20 mm (cfr. paragrafo 11, Recipienti di prova);
 - d) pellicola autoadesiva, ad esempio, per coprire le piastra a 24 pozzetti;
 - e) incubatore o locale climatizzato con regolazione della temperatura, che consenta di mantenere la temperatura a $26 (\pm 1)$ °C nei pozzetti (o nei recipienti di prova);
 - f) pH-metro;
 - g) misuratore di ossigeno;
 - h) materiale per la determinazione della durezza e della conduttività dell'acqua;
 - i) gabbia di riproduzione: piatto per strumenti, in vetro, acciaio inossidabile o altro materiale inerte; rete di acciaio inossidabile o di altro materiale inerte (con maglie di $2 \pm 0,5$ mm), per proteggere le uova deposte; substrato di riproduzione (ad esempio, piante artificiali di materiale inerte) (metodo di prova C. 48, appendice 4A (23));
 - j) pipette con imboccatura ampia per la raccolta delle uova;
 - k) recipienti di vetro per preparare diverse concentrazioni di prova e l'acqua di diluizione (becher, palloni graduati, cilindri graduati, pipette graduate) o per raccogliere le uova (ad esempio, becher, cristallizzatori);
 - l) se si utilizzano altri sistemi di esposizione, ad esempio a flusso continuo (24) o passivi (25), occorrono locali e strumentazione idonei.

Recipienti di prova

11. Si utilizzano recipienti in vetro o polistirene (ad esempio, piastre a 24 pozzetti di capacità compresa tra 2,5 e 5 ml per pozzetto). Nel caso in cui si sospetti un adsorbimento nel polistirene (ad esempio, quando si saggiano sostanze apolari, planari con valore K_{ow} elevato), per ridurre le perdite dovute all'adsorbimento si utilizzano materiali inerti (vetro) (26). I recipienti di prova sono collocati nell'incubatore in modo casuale.

Acqua e condizioni sperimentali

12. Si raccomanda di diluire l'acqua di mantenimento per ottenere gradi di durezza tipici di molte acque di superficie. L'acqua di diluizione è preparata a partire da acqua ricostituita (27). Il grado di durezza ottenuto con la diluizione deve essere equivalente a 100-300 mg/l di $CaCO_3$, per impedire un'eccessiva precipitazione del carbonato di calcio. Si può utilizzare altra acqua di superficie o di sorgente ben caratterizzata. Per ottenere un'acqua di mantenimento a bassa durezza, l'acqua ricostituita può essere diluita con acqua deionizzata secondo un rapporto massimo di 1:5 fino a raggiungere una durezza minima di 30-35 mg/l di $CaCO_3$. Prima di introdurre la sostanza chimica in esame, l'acqua è aerata fino a saturazione dell'ossigeno. La temperatura nei pozzetti è mantenuta a 26 ± 1 °C per l'intera durata della prova. Il pH deve essere compreso tra 6,5 e 8,5 e non variare all'interno di questo intervallo di non oltre 1,5 unità durante la prova; se si ritiene che il pH non si manterrà entro l'intervallo, occorre regolarlo prima di iniziare la prova. La regolazione del pH deve essere effettuata in modo che la concentrazione della soluzione madre non vari in modo significativo e che non si producano reazioni chimiche o precipitazione della sostanza chimica in esame. Per correggere il pH nelle soluzioni contenenti la sostanza chimica in esame, si raccomanda di utilizzare acido cloridrico (HCl) e idrossido di sodio (NaOH).

Soluzioni di prova

13. Le soluzioni di prova alle concentrazioni prescelte sono in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre sono di preferenza preparate semplicemente miscelando o agitando la sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Se la sostanza chimica in esame si scioglie con difficoltà in acqua, si seguono le procedure descritte nel documento di orientamento dell'OCSE n. 23 sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (28). L'uso di solventi dovrebbe essere evitato, ma in alcuni casi può rendersi necessario per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione. Se si utilizza un solvente nella preparazione delle soluzioni madre, la sua concentrazione finale non deve superare 100 µl/l e deve essere uguale in tutti i recipienti; l'uso di solventi richiede un controllo supplementare con solvente.

Mantenimento dei pesci riproduttori

14. Per la produzione delle uova si impiega uno stock di dani zebrati riproduttori selvatici e non esposti, con tasso di fecondazione ben documentato. I pesci non devono presentare sintomi di infezione e malattia riscontrabili all'esame macroscopico e non devono avere ricevuto alcun trattamento farmacologico (acuto o profilattico) nei due mesi precedenti la deposizione delle uova. I pesci riproduttori sono tenuti in acquari con capacità di carico raccomandata di 1 litro d'acqua per pesce e fotoperiodo fisso di 12-16 ore (29) (30) (31) (32) (33). Il filtraggio va regolato alla velocità ottimale, evitando velocità eccessive che provocano forti perturbazioni dell'acqua. Per i dettagli sull'alimentazione si veda l'appendice 2. Occorre evitare un'alimentazione troppo abbondante e controllare regolarmente la qualità dell'acqua e la pulizia degli acquari ripristinando, se necessario, le condizioni iniziali.

Prove di competenza

15. Per verificare la sensibilità del ceppo di pesci utilizzati si saggia, preferibilmente due volte l'anno, la 3,4-dicloroanilina come sostanza di riferimento (utilizzata negli studi di convalida (1) (2)) ottenendo una serie completa di dati sulla relazione concentrazione-risposta. I laboratori che eseguono questa prova per la prima volta sono tenuti a utilizzare la sostanza di riferimento. I laboratori che devono presentare i dati a fini di regolamentazione possono utilizzare questa sostanza chimica per dimostrare di possedere le competenze tecniche richieste per eseguire la prova.

Produzione delle uova

16. Le uova di danio zebra possono essere prodotte mediante gruppi di riproduzione (in vasche di riproduzione apposite) o riproduzione di massa (nelle vasche di mantenimento). Nel primo caso s'introducono i maschi e le femmine di un gruppo (ad esempio, in un rapporto di 2:1) nelle vasche di riproduzione alcune ore prima dell'imbrunire del giorno prima della prova. Poiché i gruppi di riproduzione di dani zebrati talvolta non riescono a deporre le uova, si raccomanda l'uso in parallelo di almeno tre vasche di riproduzione. Per evitare errori statistici di natura genetica, si raccolgono le uova di almeno tre gruppi riproduttori, le si mescolano e si selezionano in modo casuale.
17. Per la raccolta delle uova, si collocano delle gabbie nelle vasche di riproduzione o in quelle di mantenimento prima dell'imbrunire del giorno precedente alla prova o prima dell'alba del giorno stesso della prova. Poiché i pesci adulti divorano le uova, si coprono le gabbie con rete metallica di materiale inerte con maglie di dimensioni appropriate (circa $2 \pm 0,5$ mm). Se necessario, si fissano alle maglie della rete alcune piante artificiali di materiale inerte (ad esempio, in plastica o vetro) come stimolo di riproduzione (3) (4) (5) (23) (35), avendo cura di utilizzare materie plastiche degradate che non rilascino sostanze contaminanti (ftalati, ad esempio). L'accoppiamento, la deposizione delle uova e la fecondazione avvengono nei 30 minuti successivi alle prime luci dell'alba, dopodiché si può procedere delicatamente alla rimozione delle gabbie in cui sono state depositate le uova. Si raccomanda di sciacquare con acqua ricostituita le uova raccolte dalle gabbie di riproduzione.

Differenziazione delle uova

18. A una temperatura di 26 °C, dopo circa 15 minuti dalla fecondazione nelle uova ha inizio la segmentazione, con divisioni sincrone consecutive che formano 4, 8, 16 e 32 blastomeri (cfr. appendice 3 (35)). In questi stadi, lo sviluppo della blastula permette d'individuare chiaramente le uova fecondate.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione

19. Si espongono alla sostanza chimica in esame venti embrioni per concentrazione (un embrione per pozzetto). L'esposizione è eseguita in modo da mantenere durante l'intera prova la concentrazione della sostanza chimica al ± 20 % della concentrazione nominale. Se non è possibile soddisfare questa condizione in un sistema statico, si allestisce un sistema semistatico con rinnovo a una cadenza praticabile (ad esempio, ogni 24 ore). In questo caso si verificano le concentrazioni di esposizione almeno alle concentrazioni di prova minima e massima, all'inizio e alla fine di ciascun intervallo di esposizione (cfr. paragrafo 36). Se non è possibile mantenere la concentrazione di esposizione a ± 20 % della concentrazione nominale, si misurano tutte le concentrazioni all'inizio e alla fine di ciascun intervallo di esposizione (cfr. paragrafo 36). Al momento del rinnovo si procede in modo che gli embrioni rimangano coperti da una piccola quantità della vecchia soluzione di prova per evitare la disidratazione. Il disegno sperimentale può essere adattato per soddisfare i requisiti di prova di particolari sostanze (ad esempio, sistemi di dosaggio a flusso continuo (24) o passivi (25) per le sostanze facilmente degradabili o fortemente adsorbenti (29), oppure altri sistemi per le sostanze volatili (36) (37)). In ogni caso occorre ridurre al minimo qualsiasi fonte di stress per gli embrioni. Si condizionano i recipienti con le soluzioni di prova almeno 24 ore prima di avviare la prova. L'appendice 2 contiene una sintesi delle condizioni sperimentali.

Concentrazioni di prova

20. Per soddisfare i criteri statistici si utilizzano di norma cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame, intervallate secondo un fattore costante non superiore a 2,2; qualora se ne utilizzino meno di cinque occorre fornire una giustificazione. La concentrazione massima saggiata dovrebbe produrre una mortalità del 100 % e la concentrazione minima non dovrebbe causare alcun effetto osservabile, come indicato nel paragrafo 28. Per definire l'intervallo appropriato delle concentrazioni, prima di procedere alla prova finale si esegue una prova preliminare; a tal fine si utilizzano in genere dieci embrioni per concentrazione e piastre a 24 pozzetti, come da istruzioni fornite in appresso. Se si utilizzano recipienti di prova diversi (ad esempio, piccole capsule Petri) o si saggia un numero maggiore di concentrazioni, le istruzioni devono essere adeguate di conseguenza.

21. Nel paragrafo 27 e nell'appendice 4, figura 1, si trovano, rispettivamente, le istruzioni e lo schema della distribuzione delle concentrazioni nelle piastre a 24 pozzetti.

Controlli

22. Si allestiscono controlli dell'acqua di diluizione, sia negativi sia all'interno di ciascuna piastra. Se si osserva più di un decesso tra gli embrioni del controllo interno la piastra è esclusa dalla prova, il che riduce il numero delle concentrazioni usate per determinare l' LC_{50} . In caso di esclusione di un'intera piastra la capacità di valutare e distinguere gli effetti osservati può diventare più difficile, in particolare se la piastra esclusa contiene il controllo del solvente o embrioni esposti che risultano anch'essi pregiudicati. Nel primo caso, la prova deve essere ripetuta; nel secondo caso la perdita della totalità di uno o più gruppi esposti a causa della mortalità nel controllo interno rischia di limitare la capacità di valutare gli effetti e determinare il valore dell' LC_{50} .
23. Per ciascun lotto di uova utilizzate nella prova si allestisce un controllo positivo a una concentrazione fissa di 4 mg/l di 3,4-dicloroanilina.
24. Se si utilizza un solvente, si allestisce il relativo controllo esponendo al solvente un gruppo supplementare di 20 embrioni in una piastra separata a 24 pozzetti. La prova si considera accettabile se si dimostra che il solvente non ha effetti significativi sui tempi della schiusa, sulla sopravvivenza, né produce altri effetti nocivi sugli embrioni (cfr. paragrafo 8, lettera c).

Inizio dell'esposizione e durata della prova

25. Si avvia la prova non appena possibile dopo la fecondazione delle uova e la si conclude dopo 96 ore di esposizione. Si immergono gli embrioni nelle soluzioni di prova prima che abbia inizio la segmentazione della discoblastula oppure, al più tardi, prima dello stadio a 16 blastomeri. Affinché l'esposizione inizi il più rapidamente possibile, entro 90 minuti dalla fecondazione si selezionano le uova in numero almeno doppio rispetto a quello necessario per ogni gruppo esposto e le si distribuisce casualmente nelle rispettive concentrazioni e controlli (ad esempio, in cristallizzatori da 100 ml, ricoprendole completamente di soluzione).
26. Entro 180 minuti dalla fecondazione si separano le uova fecondate vitali da quelle non fecondate e le si trasferisce in piastre a 24 pozzetti precondizionate per 24 ore e riempite nuovamente con 2 ml di soluzione di prova fresca per pozzetto. Con l'ausilio di uno stereomicroscopio (preferibilmente con ingrandimento $\geq 30\times$) si selezionano le uova fecondate in fase di segmentazione che in questo processo non presentano evidenti irregolarità (ad esempio, asimmetria, formazione di vescicole) né lesioni del corion. Per la raccolta e la separazione delle uova, cfr. appendice 3, figure 1 e 3, e appendice 4, figura 2.

Distribuzione delle uova nelle piastre a 24 pozzetti

27. Si distribuiscono le uova nelle piastre a pozzetti come segue (cfr. anche appendice 4, figura 1):

- 20 uova per piastra per ciascuna concentrazione di prova;
- 20 uova in una piastra di controllo del solvente (se necessario);
- 20 uova in una piastra di controllo positivo (se necessario);
- 4 uova in ciascuna delle predette piastre come controllo interno dell'acqua di diluizione;
- 24 uova in una piastra di controllo negativo dell'acqua di diluizione.

Osservazioni

28. Gli endpoint apicali osservati in ciascun embrione sottoposto a prova sono: la coagulazione di embrioni, la mancata formazione dei somiti, il mancato distacco dell'abbozzo caudale e l'assenza di battito cardiaco (tabella 1). Queste osservazioni servono a determinare la letalità: il risultato positivo in una di esse indica il decesso dell'embrione di danio zebrato. Si registra inoltre la schiusa nei gruppi esposti e nei controlli ogni giorno a partire dalla 48^a ora. Le osservazioni sono registrate ogni 24 ore fino al termine della prova.

Tabella 1

Osservazioni degli endpoint apicali di tossicità acuta negli embrioni di danio zebrato a 24-96 ore dalla fecondazione.

	Tempo di esposizione			
	24 ore	48 ore	72 ore	96 ore
Embrioni coagulati	+	+	+	+
Mancata formazione dei somiti	+	+	+	+
Mancato distacco dell'abbozzo caudale	+	+	+	+
Assenza di battito cardiaco		+	+	+

29. *Coagulazione degli embrioni*: gli embrioni coagulati sono di color bianco latteo e appaiono scuri al microscopio (cfr. appendice 5, figura 1). Si determina il numero di embrioni coagulati dopo 24, 48, 72 e 96 ore.
30. *Mancata formazione dei somiti*: a una temperatura di 26 (\pm 1) °C, nell'embrione di danio zebrato dallo sviluppo normale dopo 24 ore si formano circa 20 somiti (cfr. appendice 5, figura 2). In un embrione che si sviluppa normalmente si osservano movimenti spontanei (contrazioni), che indicano la formazione di somiti. Si registra l'assenza di somiti dopo 24, 48, 72 e 96 ore. La mancata formazione di somiti dopo 24 ore potrebbe essere dovuta a un ritardo generale dello sviluppo. Se al più tardi dopo 48 ore la formazione di somiti non è avvenuta, gli embrioni sono considerati morti.
31. *Mancato distacco dell'abbozzo caudale*: nell'embrione di danio zebrato dallo sviluppo normale il distacco dell'abbozzo caudale dal vitello (cfr. appendice 5, figura 3) si osserva dopo l'allungamento posteriore dell'embrione. Si registra il mancato distacco dell'abbozzo caudale dopo 24, 48, 72 e 96 ore.
32. *Assenza di battito cardiaco*: a 26 (\pm 1)°C nell'embrione di danio zebrato dallo sviluppo normale il battito cardiaco è visibile dopo 48 ore (cfr. appendice 5, figura 4). La registrazione di questo endpoint richiede particolare attenzione: non è da considerarsi letale un battito irregolare (erratico) né un battito visibile senza circolazione nell'aorta addominale. Si registra l'assenza di battito cardiaco nell'embrione dopo un'osservazione di almeno un minuto con un ingrandimento minimo di 80x. La registrazione di questo endpoint va effettuata dopo 48, 72 e 96 ore.
33. Si registrano e si riportano nella relazione i tassi di schiusa di tutti i gruppi esposti e di controllo a partire dalla 48^a ora. Sebbene non sia un endpoint utilizzato per il calcolo dell'LC₅₀, la schiusa fa sì che l'embrione sia esposto senza l'interposizione del corion, che può fungere da barriera; è pertanto un elemento che aiuta a interpretare i dati.
34. La descrizione dettagliata dello sviluppo normale (35) ed esempi di sviluppo anomalo degli embrioni di danio zebrato figurano nelle appendici 3 e 5.

Misurazioni analitiche

35. All'inizio e alla fine della prova si misurano il pH, la durezza totale e la conduttività nel/i controllo/i e nella concentrazione massima della sostanza chimica in esame. Nei sistemi semistatici il pH è misurato prima e dopo il rinnovo dell'acqua. La concentrazione dell'ossigeno disciolto è misurato alla fine della prova nei controlli negativi e nella concentrazione di prova massima con embrioni vitali e deve essere conforme ai criteri di validità della prova (cfr. il paragrafo 8, lettera f). Se si sospetta che la temperatura non sia uguale nelle varie piastre a 24 pozzetti, la si misura in tre recipienti selezionati a caso; di preferenza, si registra la temperatura in continuo durante la prova o almeno su base giornaliera.
36. In un sistema statico, si misura la concentrazione della sostanza chimica in esame almeno alle concentrazioni massima e minima, ma preferibilmente in tutti i recipienti di esposizione, all'inizio e alla fine della prova. Nelle prove semistatiche (con rinnovo) in cui si prevede che la concentrazione della sostanza chimica in esame non si discosti di oltre $\pm 20\%$ dai valori nominali, si raccomanda di analizzare almeno le concentrazioni di prova minima e massima appena preparate e subito prima del rinnovo. Per le prove in cui si prevede che la concentrazione della sostanza chimica in esame si discosti di $\pm 20\%$ dai valori nominali, si devono analizzare tutte le concentrazioni appena preparate e subito prima del rinnovo. Se il volume da analizzare è insufficiente può essere utile mescolare le soluzioni di prova o utilizzare recipienti sostitutivi dello stesso materiale e aventi lo stesso rapporto volume/superficie delle piastre a 24 pozzetti. È vivamente raccomandato che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Se le concentrazioni hanno valori compresi nell'intervallo 80-120 % della concentrazione nominale, le concentrazioni con effetto devono essere espresse in rapporto alla media geometrica delle concentrazioni misurate; per maggiori dettagli, cfr. il documento d'orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (28).

PROVA LIMITE

37. Usando le procedure descritte nel presente metodo di prova, si può eseguire una prova limite a 100 mg/l della sostanza chimica in esame oppure fino al limite di solubilità della stessa nel mezzo di prova (se è inferiore), allo scopo di dimostrare che l' LC_{50} si colloca al di sopra di questa concentrazione. Si allestisce la prova limite utilizzando 20 embrioni per l'esposizione alla sostanza chimica in esame, il controllo positivo e, se necessario, il controllo del solvente e 24 embrioni per il controllo negativo. Se la percentuale di letalità alla concentrazione saggiata è superiore del 10 % alla mortalità del controllo negativo (o del controllo del solvente), occorre effettuare uno studio completo. Si registrano tutti gli effetti osservati. Se la mortalità è superiore al 10 % nel controllo negativo (o nel controllo del solvente), la prova non è valida e deve essere ripetuta.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

38. Ai fini dell'analisi statistica, in questa prova ogni pozzo è considerato una replica indipendente. Si traccia il grafico delle percentuali di embrioni per i quali l'osservazione di almeno uno degli endpoint apicali è positiva a 48 e/o 96 ore in funzione delle concentrazioni di prova. Per calcolare la pendenza della curva, i valori di LC_{50} e i limiti di confidenza (95 %) occorre applicare metodi statistici appropriati (38) e consultare il documento di orientamento dell'OCSE sugli approcci attuali all'analisi statistica dei dati sull'ecotossicità (39).

Relazione di prova

39. I seguenti dati devono figurare nella relazione di prova.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostrituente:

— caratteristiche fisiche, idrosolubilità e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;

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

Sostanza multicomponente, sostanze UVCB e miscele:

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

Organismi di prova:

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

Condizioni sperimentali:

- procedura utilizzata (ad esempio, con rinnovo semistatico);
- fotoperiodo;
- disegno sperimentale (ad esempio, numero di recipienti di prova, tipo di controlli);
- caratteristiche di qualità dell'acqua nelle vasche di mantenimento dei pesci (ad esempio, pH, durezza, temperatura, conduttività, ossigeno disciolto);
- concentrazione dell'ossigeno disciolto, pH, durezza totale, temperatura e conduttività delle soluzioni di prova all'inizio e dopo 96 ore;
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e delle soluzioni di prova, nonché frequenza di rinnovo;
- giustificazione dell'utilizzo di un solvente e della scelta dello specifico solvente utilizzato (se diverso dall'acqua);
- concentrazioni di prova nominali e risultati di tutte le analisi effettuate per determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame nei recipienti di prova, compreso l'efficienza di recupero del metodo e il limite di quantificazione (LoQ);
- dati comprovanti il rispetto dei criteri di validità della sopravvivenza complessiva nei controlli;
- tasso di fecondazione delle uova;
- tasso di schiusa nei gruppi esposti e nei controlli.

Risultati:

- concentrazione massima che non ha causato mortalità durante la prova;
- concentrazione minima che ha causato 100 % di mortalità durante la prova;
- mortalità cumulativa per ciascuna concentrazione nei momenti di osservazione raccomandati;
- valori dell' LC_{50} a 96 ore (e facoltativamente a 48 ore) per la mortalità con limiti di confidenza al 95 %, se possibile;
- grafico della curva concentrazione-mortalità alla fine della prova;
- mortalità nei controlli (controlli negativi, controlli interni, controllo positivo ed eventuale controllo del solvente);
- dati sull'esito dell'osservazione di ciascuno dei quattro endpoint apicali;
- incidenza e descrizione delle eventuali anomalie morfologiche e fisiologiche, se del caso (cfr. esempi forniti nell'appendice 5, figura 2);
- incidenti avvenuti nel corso della prova che potrebbero aver influito sui risultati;

- analisi statistica e trattamento dei dati (analisi probit, modello di regressione logistica e media geometrica per l'LC₅₀);
- pendenza e limiti di confidenza del modello di regressione della curva (trasformata) concentrazione-risposta.

Deviazioni rispetto al metodo di prova e relative spiegazioni.

Discussione e interpretazione dei risultati

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.
- (2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.
- (4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
- (5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
- (6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.
- (7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.
- (10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. In Vitro 8: 401-406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.
- (13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*: 149 (2), 196–209.
- (17) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della “pronta” (ready) biodegradabilità.
- (18) Capitolo C.29 del presente allegato, Pronta biodegradabilità — CO₂ in recipienti ermetici.
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36.
- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
- (23) Capitolo C.48 del presente allegato, Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci. Cfr. appendice 4A.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. in vitro* 23: 1436-1442.
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097–4102.
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
- (27) ISO (1996) International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [<http://www.iso.org>].
- (28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
- (30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.cac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- (32) Commissione europea (2007), raccomandazione 2007/526/CE della Commissione, del 18 giugno 2007, relativa a linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici (notificata con il numero C(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:IT:PDF>]
- (33) Unione europea (2010), direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GU L 276 del 20.10.2010, pag. 33);

- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.
- (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.
- (36) Capitolo C.2 del presente allegato, Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978
- (38) ISO (2006) International Standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Available: [<http://www.iso.org>].
- (39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Endpoint apicale: indicatore di effetti a livello della popolazione.

Blastula: formazione cellulare intorno al polo animale che ricopre una determinata parte del vitello.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Epibolia: proliferazione massiccia di cellule prevalentemente epidermiche nella fase di gastrulazione dell'embrione e loro spostamento dal lato dorsale verso quello ventrale mediante il quale gli strati cellulari entodermici si invaginano e il vitello si ritrova all'interno dell'embrione.

Prova a flusso continuo: prova nella quale le soluzioni saggiate scorrono nel sistema sperimentale con un flusso continuo durante il periodo di esposizione.

Controllo interno della piastra: controllo interno costituito, in una piastra a 24 pozzetti, da 4 pozzetti riempiti di acqua di diluizione al fine di individuare la contaminazione potenziale delle piastre causata dal fabbricante o dal ricercatore durante la procedura e ricercare eventuali effetti che possano influire sull'esito della prova (ad esempio, gradiente di temperatura).

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

Acqua di mantenimento: acqua in cui si allevano i pesci adulti.

Concentrazione letale mediana (LC₅₀): concentrazione della sostanza chimica in esame ritenuta letale per il 50 % degli organismi esposti nell'arco temporale della prova.

Prova con rinnovo semistatico: prova con un regolare rinnovo delle soluzioni di prova a cadenza prestabilita (ad esempio, ogni 24 ore).

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

Somite: negli embrioni dei vertebrati, gruppo di cellule mesodermiche posto ai lati del tubo neurale da cui si svilupperanno il derma (dermatomo), i muscoli scheletrici (miotomo) e le vertebre (sclerotomo).

Prova statica: prova durante la quale le soluzioni di prova restano sempre inalterate.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata secondo il presente metodo di prova.

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

Appendice 2

MANTENIMENTO, RIPRODUZIONE E CONDIZIONI TIPO PER LE PROVE DI TOSSICITÀ ACUTA
SUGLI EMBRIONI DI DANIO ZEBRATO

Danio zebtrato (<i>Danio rerio</i>)		
Origine delle specie	India, Birmania, Malacca, Sumatra	
Dimorfismo sessuale	Femmina: ventre prominente quando portano le uova Maschio: più sottile, di tonalità arancio tra le strisce blu longitudinali (particolarmente visibile nella pinna anale)	
Regime alimentare	Fiocchi disidratati (max. 3 % del peso del pesce al giorno) 3-5 volte al giorno + naupli di artemia (<i>Artemia</i> sp.) e/o dafnie di dimensioni appropriate provenienti da fonte non contaminata. Il cibo vivo arricchisce l'ambiente e pertanto deve far parte, per quanto possibile, del regime alimentare. Per garantire una qualità dell'acqua ottimale si rimuovono il cibo non consumato e gli escrementi circa un'ora dopo la somministrazione del cibo.	
Peso approssimativo del pesce adulto	Femmina: 0,65 ± 0,13 g Maschio: 0,5 ± 0,1 g	
Mantenimento dei pesci riproduttori	Illuminazione	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro) 10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio); fotoperiodo: 12-16 ore
	Temperatura dell'acqua	26 (±1) °C
	Qualità dell'acqua	O ₂ ≥ 80 % del valore di saturazione, durezza: ad esempio, ~30-300 mg/l CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤48mg/l, NH ₄ ⁺ e NO ₂ ⁻ : < 0,001 mg/l, cloro residuo <10 µg/l, cloro organico totale < 25 ng/l, pH = 6,5 — 8,5
	Altri criteri di qualità dell'acqua	Particolato <20 mg/l, carbonio organico totale < 2 mg/l, pesticidi organofosforati totali < 50 ng/l, pesticidi organoclorurati totali + difenili policlorurati < 50 ng/l
	Dimensioni delle vasche di mantenimento	180 l, 1 pesce/l, ad esempio
	Depurazione dell'acqua	Permanente (con filtri a carbone); altre possibilità: combinazione con sistemi di mantenimento a rinnovo semistatico o a flusso continuo con rinnovo costante dell'acqua
	Rapporto maschi/femmine raccomandato per la riproduzione	2:1 (o riproduzione di massa)
Vasche di riproduzione	Ad esempio vasche da 4 l munite di fondo con griglia in acciaio e piante artificiali come stimolo di riproduzione; tappetini riscaldanti esterni, o riproduzione di massa all'interno delle vasche di mantenimento	
Struttura e aspetto delle uova	Corion stabile (ossia, molto trasparente, non colloso, diametro ~ 0,8-1,5 mm)	
Tasso di riproduzione	Una femmina matura produce almeno 50-80 uova al giorno. In alcuni ceppi questo tasso può essere molto più alto. Il tasso di fecondazione deve essere ≥70 %. Nei pesci che si riproducono per la prima volta, il tasso di fecondazione delle uova può essere inferiore nei primi cicli.	
Tipo di prova	Statica, semistatica con rinnovo, a flusso continuo, 26 (± 1) °C, recipienti di prova condizionati per 24 ore (ad esempio, piastre a 24 pozzetti di capienza 2,5-5 ml/pozzetto)	

Appendice 3

SVILUPPO NORMALE DEL DANIO ZEBRATO A 26 °C

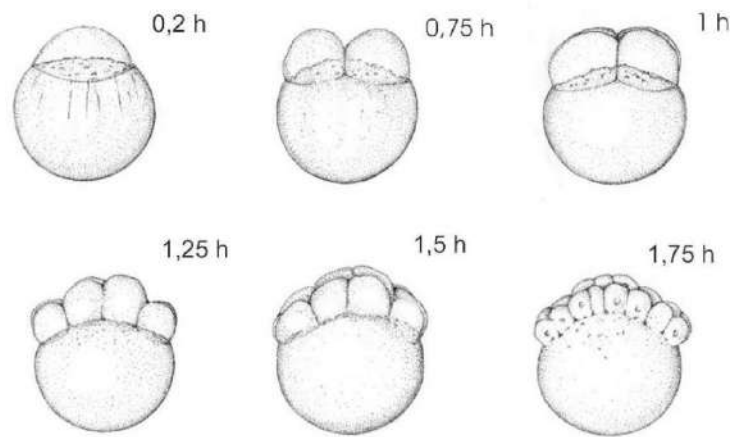


Figura 1 — Alcuni stadi iniziali dello sviluppo del danio zebtrato (*Danio rerio*): 0,2-1,75 ore dopo la fecondazione (Kimmel *et al.*, 1995 (35)). Per diagnosticare la fecondazione e la vitalità delle uova è utile basarsi sulla cronologia di uno sviluppo normale (cfr. paragrafo 26, Selezione delle uova fecondate).

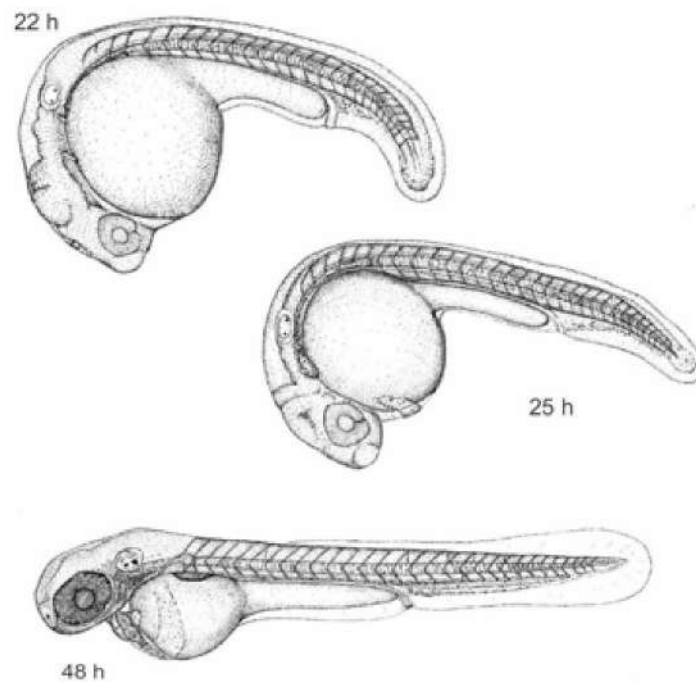


Figura 2 — Alcuni stadi posteriori dello sviluppo del danio zebtrato (*Danio rerio*) (embrione privo del corion per ottimizzare la visibilità): 22 — 48 ore dopo la fecondazione (Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

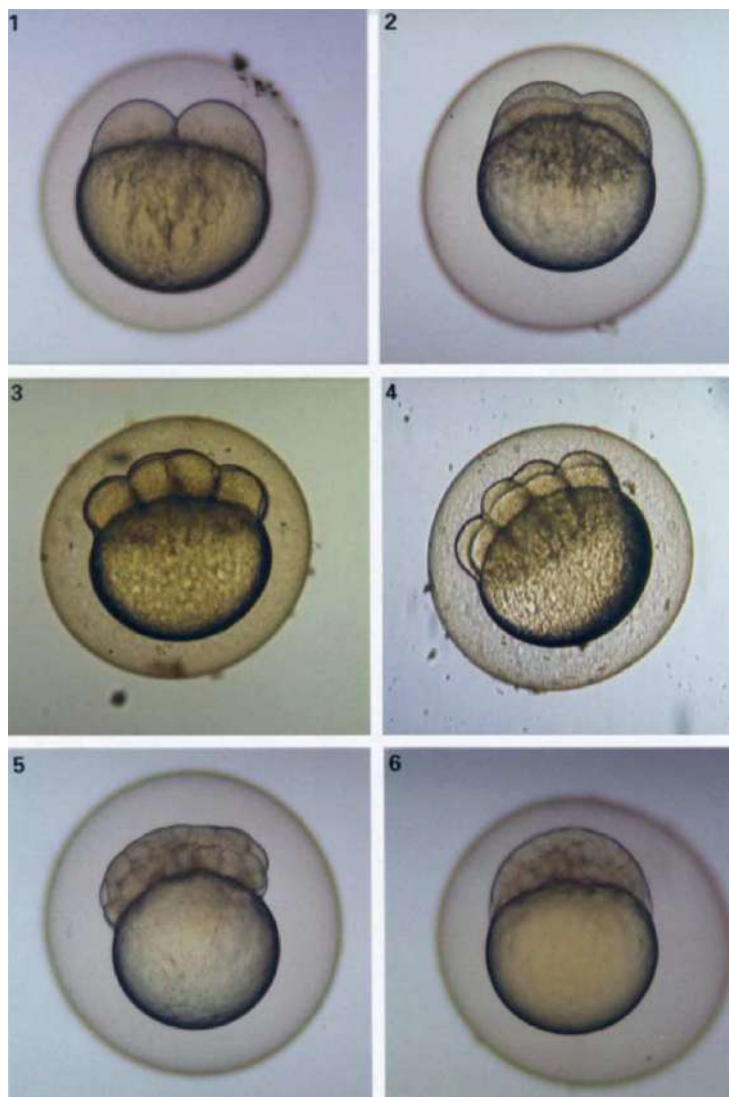
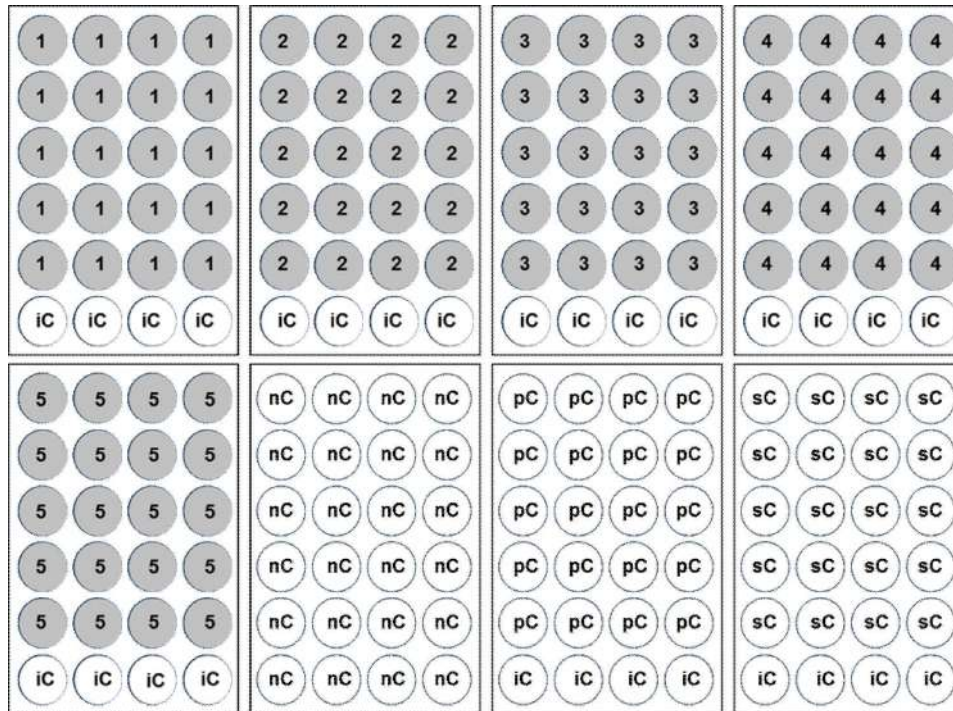


Figura 3 — Sviluppo normale di embrioni di danio zebrato (*Danio rerio*): (1) 0,75 ore, stadio a 2 cellule; (2) 1 ora, stadio a 4 cellule; (3) 1,2 ore, stadio a 8 cellule; (4) 1,5 ore, stadio a 16 cellule; (5) 4,7 ore, inizio dell'epibolia; (6) 5,3 ore, epibolia al 50 % circa (Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

Appendice 4

Figura 1

Allestimento delle piastre a 24 pozzetti



1-5 = cinque concentrazioni di prova/sostanza chimica;

nc = controllo negativo (acqua di diluizione);

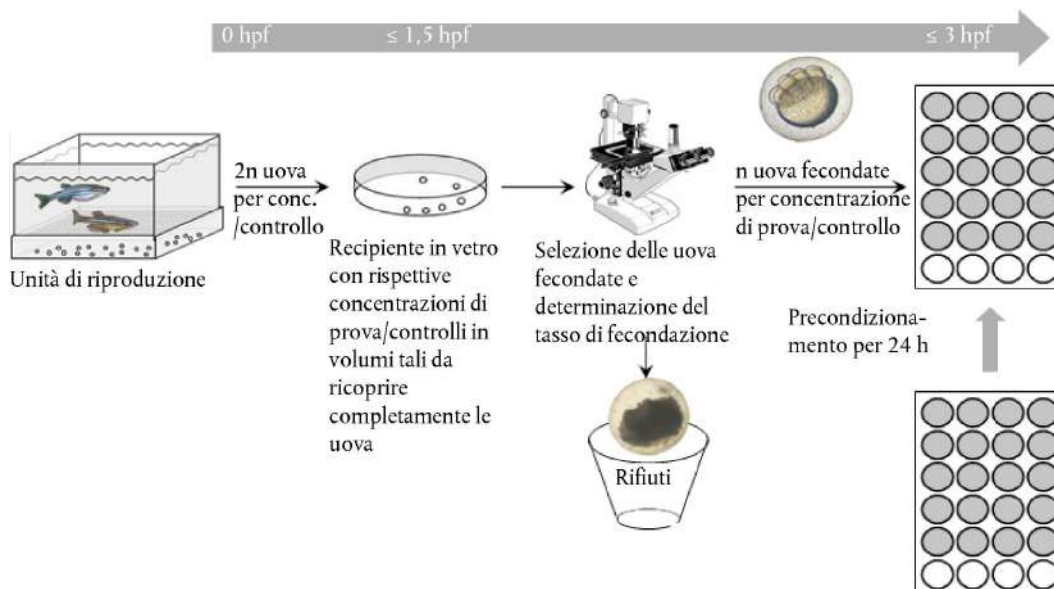
iC = controllo interno della piastra (acqua di diluizione);

pC = controllo positivo (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = controllo del solvente

Figura 2

Schema della procedura sperimentale di tossicità acuta sugli embrioni di Danio zebbrato (da sinistra a destra): produzione delle uova, raccolta delle uova, pre-esposizione subito dopo la fecondazione in recipienti di vetro, selezione delle uova fecondate con un microscopio rovesciato o un binocolare e distribuzione delle uova fecondate nelle piastre a 24 pozzetti preparate con le rispettive concentrazioni di prova/controlli, n = numero di uova necessarie per ogni concentrazione di prova/controllo (in questo caso 20), hpf = ore trascorse dalla fecondazione



Appendice 5

ATLANTE DEGLI ENDPOINT LETALI PER LA PROVA DI TOSSICITÀ ACUTA SUGLI EMBRIONI DI DANIO ZEBRATO

I seguenti endpoint apicali indicano tossicità acuta e, di conseguenza, il decesso degli embrioni: *coagulazione dell'embrione*, *mancato distacco dell'abbozzo caudale*, *mancata formazione dei somiti* e *assenza di battito cardiaco*. Per illustrarli sono state selezionate le seguenti micrografie.

Figura 1

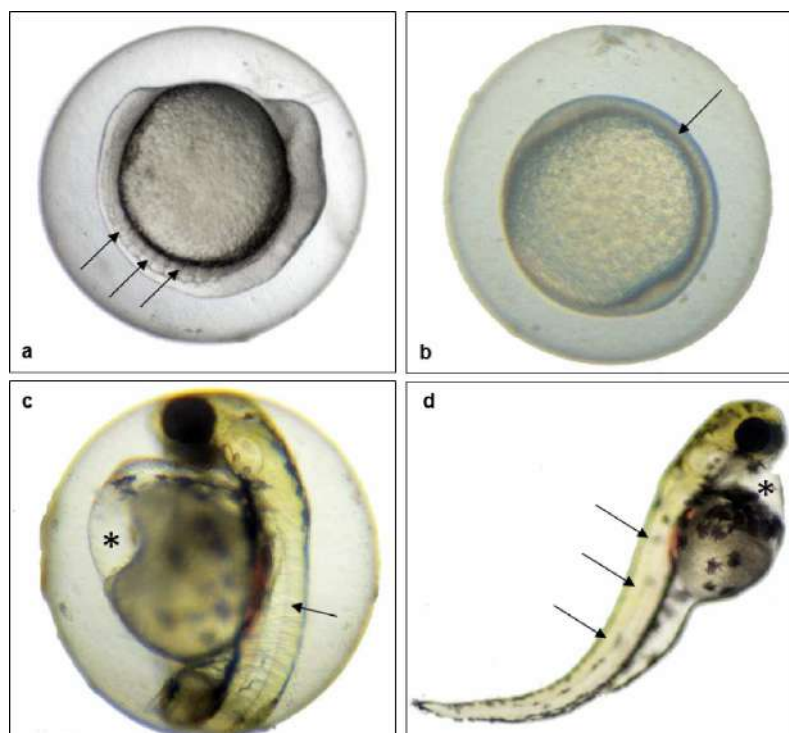
Coagulazione dell'embrione:



con illuminazione a campo chiaro si distingue una serie di inclusioni opache negli embrioni coagulati di danio zebrato.

Figura 2

Mancata formazione dei somiti:



malgrado il ritardo di sviluppo di circa 10 ore, l'embrione di danio zebrato di 24 ore in (a) presenta somiti ben sviluppati (→), mentre l'embrione in (b) non presenta alcun segno di formazione di somiti (→). Si osserva la netta formazione di somiti (→) nell'embrione di danio zebrato di 48 ore in (c), nonostante un edema pronunciato del sacco vitellino (*), mentre l'embrione di danio zebrato di 96 ore in (d) non presenta alcun segno di formazione di somiti (→). Si noti anche in (d) la deviazione della colonna vertebrale (scoliosi) e l'edema pericardico (*).

Figura 3

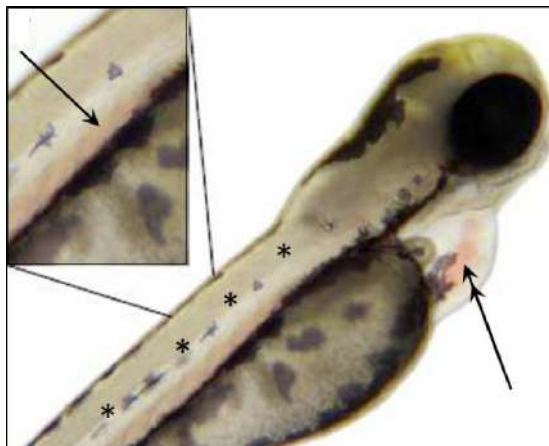
Vista laterale del mancato distacco dell'abbozzo caudale



(a: →; embrione di danio zebrato di 96 ore). Si osservi anche l'assenza di abbozzo oculare (*).

Figura 4

Assenza di battito cardiaco



L'assenza di battito cardiaco è, per ovvie ragioni, difficile da illustrare in una micrografia. La non convulsione del cuore (doppia freccia) indica l'assenza di battito cardiaco. L'immobilità delle cellule ematiche, ad esempio nell'aorta addominale (→ nel riquadro) non è un indicatore dell'assenza di battito cardiaco. Si osservi anche la mancata formazione dei somiti in questo embrione (*, aspetto omogeneo anziché segmentale dei tessuti muscolari). Il tempo di osservazione per la registrazione dell'assenza di battito cardiaco deve essere di almeno un minuto con un ingrandimento minimo di 80×.